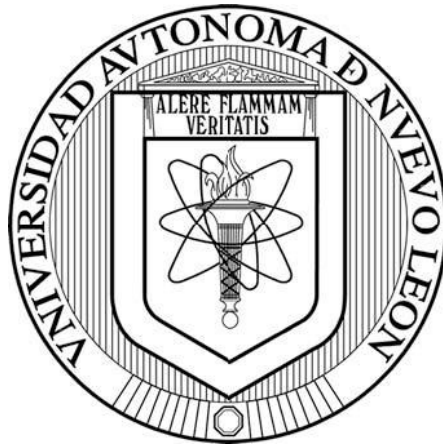


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“APLICACIÓN DE LA FARMACOGENÓMICA EN LA
PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA A FÁRMACOS DE
ALTA VARIABILIDAD FARMACOCINÉTICA”**

Tesis realizada por:

M. C. RAFAEL BALTAZAR REYES LEÓN CACHÓN

**Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias
con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

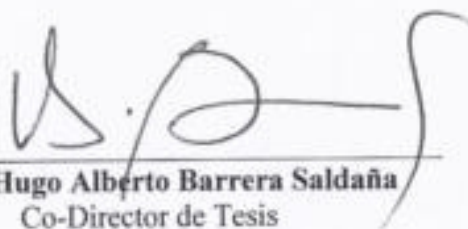
JULIO 2013

**APLICACIÓN DE LA FARMACOGENÓMICA EN LA PREDICCIÓN DE LA
RESPUESTA A FÁRMACOS CON ALTA VARIABILIDAD
FARMACOCINÉTICA.**

Aprobación de Tesis:



Dr. C. Jorge Angel Isidro Ascacio Martínez
Director de Tesis



Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña
Co-Director de Tesis



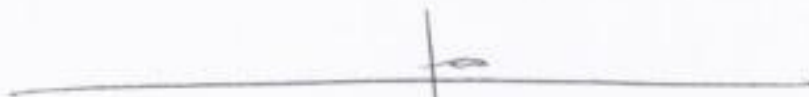
Dra. C. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez
Co-Directora de Tesis



Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez
Comisión de Tesis



Dra. C. Magdalena Gómez Silva
Comisión de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

“La dicha de la vida consiste en: tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”

Thomas Chalmer

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

M. C. Rafael Baltazar Reyes León Cachón

Candidato al grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Título del estudio: APLICACIÓN DE LA FARMACOGENÓMICA EN LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA A FÁRMACOS DE ALTA VARIABILIDAD FARMACOCINÉTICA

Número de páginas: 113

Área de Estudio: Farmacogenómica

Introducción: Factores como la edad, sexo, grupo étnico y herencia, intervienen en las diferencias interindividuales que subyacen en las variaciones del proceso de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) que experimenta un fármaco en el cuerpo humano. Los factores hereditarios contribuyen del 15 al 30% de dicha variación interindividual y por lo tanto en el grado de respuesta a cierta clase de fármacos, tales como Atorvastatina (ATV) que presenta alta variabilidad interindividual en su farmacocinética y por ende variación en el grado de respuesta a dicho medicamento.

Objetivo: Determinar las variantes génicas que influyen en el metabolismo de fármacos de alta variabilidad farmacocinética.

Materiales y Métodos. Se realizó un estudio piloto, partiendo de un grupo constituido por 60 voluntarios sanos participantes en un protocolo de bioequivalencia para ATV, para medir la concentración plasmática de ATV se validó el método de

cuantificación utilizando un HPLC-MS-MS, la concentración máxima en plasma (C_{\max}) y el tiempo establecido para alcanzar C_{\max} (T_{\max}), fueron calculados de los datos concentración-tiempo observados en los niveles plasmáticos. Los parámetros farmacocinéticos estimados fueron: el área bajo la curva de la concentración plasmática desde el tiempo 0 al tiempo de la última determinación (AUC_{0-t}) calculado usando la regla trapezoidal lineal-logarítmica: el área bajo la curva de 0 a infinito ($AUC_{0-\infty}$), aclaramiento sobre la fracción de la dosis absorbida (Cl/F), volumen de distribución sobre la fracción de la dosis absorbida (Vd/F), constante de eliminación en la fase terminal (K_e) y vida media en la fase terminal del fármaco ($T_{1/2}$). Posteriormente, el metabolismo fue clasificado en cada uno de los sujetos a partir de sus perfiles farmacocinéticos. En el genoma de estos voluntarios fueron rastreados 87 polimorfismos génicos en 36 genes relacionados con el metabolismo y respuesta a fármacos. Para cada polimorfismo se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), la asociación entre los fenotipos (metabolizador lento, normal y rápido) y genotipos se realizó por medio de una prueba exacta de Fisher (valor de significancia $p < 0.05$).

Resultados y Discusión. Con respecto a los tipos de metabolismo para ATV, se encontraron las siguientes frecuencias: normal, lento y rápido de 41.47%, 30.00% y 28.33%, respectivamente. Los resultados aquí encontrados fueron similares a los encontrados para la población del oeste de México. Los 36 genes analizados se encontraron en EHW y las frecuencias alélicas de marcadores en genes del metabolismo de ATV fueron similares a las encontradas en otras poblaciones. El marcador C3435T del gen *MDR1* fue el único que se encontró asociado con los fenotipos ($p = 0.04$).

Conclusiones. Estos resultados preliminares ponen en evidencia que el marcador C3435T del gen *MDR1* en nuestra población tiene un importante papel en el metabolismo de ATV y reclaman el caracterizar más exhaustivamente los genes de interés para encontrar mutaciones que al estar presentes en la población mexicana, pero ausentes de la población española, no se contemplan en el dispositivo diagnóstico usado para este estudio piloto.

Igualmente, apuntan a la necesidad de extender este estudio piloto a un mayor número de voluntarios manifestando variabilidad farmacocinética en otros estudios de bioequivalencia de fármacos como el aquí usado a modo de piloto.

Firma del Director de Tesis

Dr. en C. JORGE ÁNGEL ISIDRO ASCACIO MARTÍNEZ

DEDICATORIA

A mis padres:

A Rosario de Fátima Cachón Polanco, por todo el amor que siempre me ha brindado desde que abrí los ojos, porque me ha enseñado a perseverar y a no claudicar en los momentos más difíciles.

A Rafael Baltazar Reyes León Estrella por todo su cariño, por el apoyarme en todos mis aventuras, porque me ha enseñado a ser paciente.

A mi hermana que ha sido mi compañera y mi amiga durante mi vida, con la que he compartido todo.

A mi familia que siempre me ha apoyado y que siempre están al pendiente de mí.

AGRADECIMIENTOS

La lista de agradecimientos es interminable pues durante este recorrido he conocido a muchas personas, las cuales de alguna manera me han ayudado para concluir esta etapa...

A Dios por su bendición y protección.

A mi madre que siempre ha sido mi guía.

A mi padre por su comprensión y apoyo incondicional.

A mi hermana por todo su cariño.

A mi novia Nayeli Ibarra Camacho, Antonio y Rebeca por todo su cariño y apoyo.

A mis tíos Mirna y Manuel, así como también a mis primos por todo su apoyo.

A mi tío Colola por su apoyo y por sus visitas, siempre es bueno ver a alguien de la familia.

Al Dr. Jorge Ascacio Martínez por brindarme la oportunidad de superarme y formar parte de su grupo de trabajo, por su gran apoyo y atención.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez por formarme y por toda la ayuda que me ha brindado.

A la Dra. Magdalena Gómez Silva por toda su ayuda incondicional y brindarme sus conocimientos.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña por sus enseñanzas y formación.

A la Dra. Lourdes Garza Rodríguez por su amabilidad, disposición y amistad.

A toda la comisión de tesis por sus consejos y sugerencias.

Al Dr. Everardo Piñeyro por todo su apoyo y ayuda para realizar este trabajo.

A la Maestra María Elena Gamino por toda su ayuda y amistad.

Al Dr. Ricardo Cerda Flores por su ayuda y total disposición.

A la Dra. Lupita Moreno por su total apoyo y atenciones.

A los doctores Gloria, Adrián y Rigoberto por todo su apoyo.

Al Dr. Francisco Velázquez por sus valiosos consejos.

A todo el personal de bioquímica, en especial a Norma Estrella por su amistad, ayuda y cariño, a Juany Hinojosa, Raquel Cardiel Lourdes Mendoza, Ariadna López, Daniel Rodríguez, Angélica y Don Lalo, por toda su ayuda y amabilidad.

A todo el personal de Ipharma S. A. de C. V., por todo el apoyo, Micaela Rodríguez, Verónica Contreras, Alma y Edgar y a todo el personal que por las prisas haya olvidado, pero que son muy importantes para mí, en especial a mis compañeros de la unidad analítica, el Maestro Adrián Fernández, Esthela Pozos, Nelson López, Martha Cavazos, Emigdio Soto, Anabel Torres, Catalina Cortez, Georgina Espinosa, Mayra Castillo, Francisco Galván y de aseguramiento de calidad, Erika Saldivar y al Dr. Rigoberto Vargas.

A Yael C. de la Torre, Ricardo Gutiérrez, Oscar Fajardo, Mario Simental, Alan Márquez, Diana Pérez, Iram Rodríguez y a todos mis compañeros de posgrado por su amistad y compañía durante esta travesía.

A los doctores Mauricio Salinas y Alí Pérez por su amistad, consejos y siempre total apoyo.

A mis amigos y compañeros de la UDEM, Marcelo, Damaris, Berenice, Ivonne, Oracio, Juany, Cesar, Ingrid, Elsa por su apoyo y disposición.

A todos mis amigos que siempre han sido un apoyo.

Al M. C. Gregorio Alcázar por su ayuda.

A todas esas personas que son especiales para mí...

Mis más sinceros agradecimientos.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		
Página		
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Industria farmacéutica actual	1
1.2	Investigación y producción tradicional de nuevos fármacos	3
1.3	Fármacos de nueva generación	3
1.4	Investigación farmacéutica	5
1.4.1	Investigación pre-clínica	5
1.4.2	Investigación clínica	8
1.4.2.1	Estudios de fase clínica I	9
1.4.2.2	Estudios de fase clínica II	9
1.4.2.3	Estudios de fase clínica III	10
1.4.2.4	Estudios de fase clínica IV	11
1.4.2.5	Estudios de bioequivalencia	11
2.	METABOLISMO DE FÁRMACOS Y SU VARIACIÓN	13
2.1	Biotransformación	13
2.2	Diferencias interindividuales del metabolismo de fármacos	15
2.3	Efectos variables de los fármacos	16
2.4	Genética y farmacología	17
3.	FARMACOGENÉTICA	19
3.1	De la genómica a la farmacogenética	19
3.2	Variación genética y genómica	21
3.3	La importancia de la farmacogenética	22
3.4	Pruebas farmacogenéticas de acompañamiento	24

3.4.1 Estudios de farmacogenética clínica	27
3.4.2 La farmacogenética en la investigación clínica	28
3.4.3 Dispositivos diagnósticos farmacogenéticos	29
3.5 Justificación	31
3.6 Hipótesis	32
3.7 Objetivos	33
3.7.1 Objetivo general	33
3.7.2 Objetivos específicos	34
4. MATERIAL Y MÉTODOS	35
4.1 Modelo experimental	35
4.2 Validación del método de cuantificación	37
4.3 Sujetos de estudio	39
4.4 Obtención de los perfiles farmacocinéticos	39
4.5 Análisis de los perfiles farmacocinéticos	40
4.6 Clasificación metabólica	41
4.7 Obtención de ADN	41
4.7.1 Genotipificación de polimorfismos	42
4.8 Análisis estadístico para determinar posibles asociaciones entre fenotipos y genotipos	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Identificación de protocolos de fármacos de alta variabilidad farmacocinética	46
5.2 Validación del método de cuantificación	52
5.3 Análisis de los perfiles farmacocinéticos	56
5.3.1 Fenotipos metabólicos	57

5.4 Frecuencias alélicas y genotípicas	61
5.5 Análisis estadístico para determinar posibles asociaciones entre fenotipos y genotipos	64
6. DISCUSIÓN	67
7. CONCLUSIÓN	70
8. PERSPECTIVAS	73
• ANEXO 1	83
• ANEXO 2	104
• ANEXO 3	105
• REFERENCIAS	106

LISTA DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Lista de genes y polimorfismos que analiza el PHARMACHIP	44
2	Identificación de los protocolos de fármacos de alta variabilidad farmacocinética.	47
3	Parámetros de calidad del ADN extraído	48
4	Datos demográficos de los voluntarios del protocolo de ATV	50
5	Valores promedio de los parámetros de calidad del ADN	51
6	Especificidad del método de cuantificación	53
7	Linealidad del método de cuantificación	53
8	Límite de cuantificación y límite de detección	54
9	Estabilidad de la sustancia	55
10	Precisión, exactitud, recobro, determinación en PH y PQ	55
11	Datos farmacocinéticos promedio de ATV en los voluntarios	56
12	Valores promedio de los parámetros farmacocinéticos por fenotipo.	59
13	Frecuencias alélicas y genotípicas de los genes involucrados en el metabolismo de fármacos	61
14	Análisis de asociación del gen <i>CYP3A4</i>	64
15	Análisis de asociación del gen <i>CYP3A5</i>	65
16	Análisis de asociación del gen <i>MDR1</i>	65
17	Asociación entre los valores farmacocinéticos promedio y genotipos del polimorfismo C3435T del gen <i>MDR1</i>	66

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Metabolismo de fármacos.	14
2	Variabilidad Genética-Fenotipo-Farmacogenómica.	26
3	Vías metabólicas de las estatinas.	36
4	Plot de discriminación alélica para la mutación INSG2470 en el gen de <i>COL 7A</i> .	49
5	Origen y ocupación de los voluntarios del protocolo de ATV.	50
6	Evaluación de la integridad del DNA.	51
7	Amplificación de las muestras de ATV para el gen de referencia GH.	52
8	Dendrograma con enlace de Ward y distancia de Manhattan.	58
9	Diferencias de las curvas farmacocinéticas y los parámetros farmacocinéticos entre fenotipos metabolizadores.	60
10	Clasificación metabólica de las estatinas.	74
11	Clasificación metabólica de los antihipertensivos.	75
12	Clasificación metabólica de los analgésicos.	76
13	Clasificación metabólica de otros fármacos.	77
14	Clasificación metabólica de las Carbamazepina.	78
15	Ejemplo del diseño de primers para el exón 1, 9 y 12.	79
16	Estandarización de las 14 PCRs.	80
17	Alineamiento de las secuencias del exón 9.	81

ABREVIATURAS

FDA	Food and Drug Administration
ADR	Adverse Drug Reaction
PGH	Proyecto del Genoma Humano
ADME	Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción
ATV	Atorvastatina
EMA	European Medicine Agency
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
IND	Investigational New Drug Application and Safety
IRB	Institutional Review Board
IMC	Índice de masa corporal
SC	Superficie corporal
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VHC	Virus de hepatitis C
VHB	Virus de hepatitis B
COFEPRIS	Comisión Federal de Protección Contra Riesgos Sanitarios
mL	Mililitro
μ g	Microgramo
ng	Nanogramo
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
C_{max}	Concentración máxima en plasma
T_{max}	Tiempo establecido para alcanzar C_{max}
K_e	Constante de eliminación en la fase terminal
$T_{1/2}$	Vida media en la fase terminal del fármaco
$AUC_{0-\infty}$	Área bajo la curva de 0 a infinito
Cl/F	Aclaramiento sobre la fracción de la dosis absorbida
AUC_{0-t}	Área bajo la curva de la concentración plasmática desde el tiempo 0 al tiempo de la última determinación
Vd/F	Volumen de distribución sobre la fracción de la dosis absorbida

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Industria farmacéutica actual

La tecnología es fundamental para el progreso científico y crítica para la competitividad en la industria. La farmacéutica la emplea para el desarrollo de nuevos medicamentos y terapias.¹ No obstante, la generación de nuevas alternativas farmacológicas aún requiere de un proceso largo y costoso, debido a que el desarrollo de un fármaco pasa por distintas fases de investigación. Éstas, se dividen principalmente en fases preclínicas y clínicas, mediante las cuales se evalúa que la molécula bajo escrutinio reúna los requerimientos de eficacia terapéutica y seguridad exigidos para su comercialización.²

Hacia el final de la década de 1960 fue cuando los gobiernos comenzaron a emitir regulaciones sobre el desarrollo de nuevos medicamentos, enfocándose sobre sus

aplicaciones e inocuidad a través de pruebas en seres vivos. Esto repercutió en la industria, alargando los periodos de aprobación de dichos fármacos y aumentando el gasto de investigación para el lanzamiento de nuevos principios activos al mercado, consecuentemente reduciendo los ingresos de las empresas desarrolladoras de los mismos.³

A la par de estos eventos, hacia finales de 1970 surgieron nuevos tipos de empresas, tales como las de biotecnología y las de bioinformática, para ofrecer nuevas alternativas de desarrollo acelerado de nuevos medicamentos, sobre todo de naturaleza biológica. Las grandes empresas farmacéuticas tardaron en decidir si incursionar o no en esta nueva área del sector, ya que esto les significaba invertir un elevado capital en nuevos recursos humanos y tecnología para investigación y desarrollo (I & D). Ya para la década de 1980, las empresas del sector farmacéutico deciden integrarse a este nuevo segmento, pero para que la inversión en investigación y desarrollo resultara redituable, consiguieron en Estados Unidos de América (EUA) que la vigencia de explotación para las patentes fuera por 20 años, a partir de su aprobación y no desde la fecha de solicitud de la misma.

En la actualidad son dos los organismos internacionales principales dedicados a la regulación del lanzamiento de nuevos medicamentos: en los EUA la administración de alimentos y medicamentos (FDA) y en la Comunidad Económica Europea la Agencia de Evaluación de Medicamentos (EMA).³ Para poder contender con las crecientes exigencias regulatorias de estos organismos, la industria farmacéutica ha venido apoyando su I & D con otras disciplinas, como la biología molecular, la biotecnología, la

bioinformática y las ciencias genómicas.^{1,2} La biotecnología moderna reúne a estas disciplinas, dominando la era actual de la industria farmacéutica.

1.2 Investigación y producción tradicional de nuevos fármacos

A través de la historia de la farmacéutica, las plantas han sido la principal materia prima de donde se obtienen los principios activos de los medicamentos. No obstante, la química ha venido desplazando esta práctica de manera gradual, siendo en la actualidad la principal fuente proveedora de nuevas moléculas con actividad farmacológica.²

De un promedio de 5,000 a 10,000 compuestos candidatos evaluados, al final sólo uno de ellos es aprobado. Por lo tanto, el proceso que sufre una molécula desde que es descubierta hasta que se encuentre disponible al público es muy largo (aproximadamente de 10 a 15 años). Pasando por varios procesos de evaluación agrupados principalmente en las referidas fases pre-clínica y clínica.⁴

1.3 Fármacos de nueva generación

La biotecnología molecular y celular tuvo sus inicios a finales de la década de 1970, al emerger la tecnología del ADN recombinante, con la cual fue posible la clonación de genes para expresar sus productos proteicos en hospederos biotecnológicos. El impacto de este logro fue mayúsculo en la investigación médica y de inmediato

capitalizada por la primera empresa de biotecnología moderna del mundo: Genentech. Para mediados de la siguiente década, ésta ya estaba logrando producir la primera proteína humana de manufactura bacteriana, la insulina recombinante (Humulina), empleada en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo I. Otro ejemplo se dio en el año de 1989, cuando Amgen anunció que había logrado clonar y expresar el gen de la Eritropoyetina (Epogen) que se utiliza en el tratamiento de anemia asociada a falla renal crónica, entre otras patologías. Actualmente la biotecnología se emplea en diversas áreas: desde la confección de nuevas biomoléculas terapéuticas y vacunas, hasta la producción de nuevos alimentos, enzimas y otros productos. También se enfoca en la identificación de proteínas y cómo influyen éstas en la génesis de las enfermedades, lo que se ha acelerado enormemente⁵ a partir de la información generada por el proyecto del genoma humano (PGH), pues éste ha contribuido con herramientas para predecir por ejemplo la capacidad de cada uno de nosotros para responder a los tratamientos farmacológicos.⁶ Precisamente los nuevos horizontes de la farmacogenética están enfocados a identificar las variaciones genómicas existentes entre las diversas poblaciones y explotar esta información a través de aplicaciones prácticas; dicho de otra manera, diseñar medicamentos personalizados en base a las variaciones específicas de cada etnia y dentro de ésta, de cada individuo.⁷

Independientemente de la naturaleza del fármaco, sea este una molécula química o biotecnológica, para aspirar a su aprobación para la venta al público, se someten básicamente a las mismas fases de investigación pre-clínica y clínica.

1.4 Investigación farmacéutica

1.4.1 Investigación pre-clínica

En la fase pre-clínica se establece el objetivo o blanco terapéutico, a través del estudio de la enfermedad o la selección de una molécula que haya mostrado algún tipo de efecto farmacológico. En la mayoría de los casos, los blancos farmacológicos son individuales, entre los que podemos mencionar: un gen (oncogen *MYC*), una proteína o algún agente infeccioso, relacionado a la etiología de alguna enfermedad. Posteriormente, al seleccionar algún blanco terapéutico, se determina la repercusión de la molécula en estudio sobre el blanco farmacológico y su comportamiento se confirma mediante estudios en animales.

Como ya se mencionó, toda esta comprensión de las bases de las enfermedades se ha visto acelerada por la conclusión del PGH en el 2003. Éste arrojó una nueva imagen detallada de la maquinaria del cuerpo y de las instrucciones para generarlo y operarlo: el genoma. Aunado a esto, el proyecto HapMap y el varioma pretenden identificar cuáles son las variaciones genómicas que en distintas poblaciones están asociadas a la aparición de enfermedades. Este avance ha revolucionado y evolucionado la manera de identificar los posibles objetivos farmacológicos.

Una vez que se ha determinado el blanco, los investigadores se enfocan en la búsqueda de un fármaco.⁴ Esta fase conocida como fase química, es donde se elige una molécula candidata con características prometedoras (que ejerza un efecto farmacológico que cause remisión de la enfermedad). La búsqueda de este potencial fármaco se aborda de diferentes maneras: ya sea que la molécula se obtenga de fuentes naturales, como de plantas o bacterias y que posteriormente sea modificada por síntesis química. Esta última, con el avance de la tecnología también ha prosperado, al contar los científicos con programas de modelación computacional (*in silico*) que facilitan la síntesis de metabolitos de *novo* y que predicen su potencial acción farmacológica.^{2,4,8}

El empleo de la robótica, así como la explotación de la informática y programas computacionales, llevan a la farmacéutica moderna a realizar análisis masivos simultáneos (selección de alto rendimiento o “high throughput screening” por sus siglas en inglés), de cientos o miles de moléculas para determinar si alguna de ellas tiene alguna actividad farmacológica prometedora. Aunado a esto, la estrecha relación que se tiene con la biotecnología, permite a la farmacéutica acceder a la ingeniería genética, para utilizar microorganismos, células e incluso animales de laboratorio y hasta de granja, para manipularlos genéticamente y convertirlos en biorreactores para la producción de posibles moléculas terapéuticas, tales como: proteínas recombinantes (por ejemplo, insulina), anticuerpos y vacunas.⁴

Posterior a la fase química se procede a una fase biológica, que consiste en la evaluación de la toxicidad y citotoxicidad *in vitro* (por ejemplo, ensayos con *Artemia salina* y células en cultivo, respectivamente),^{9,10} ensayo de la actividad biológica, solubilidad en medios fisiológicos y si estos compuestos tienen la propiedad de difundir

a través de las barreras intestinales y hemato-encefálicas. Es importante establecer la estabilidad metabólica del compuesto, como pre-requisito a los ensayos de farmacología y toxicología *in vivo* (en animales).^{2,4,8} Los modelos animales empleados en la fase pre-clínica ofrecen una visión preliminar del comportamiento del fármaco en un organismo vivo y posteriormente los datos obtenidos se pueden extrapolar a los humanos. En la investigación biomédica se han usado varios modelos animales, entre los que podemos mencionar: los ratones y ratas utilizados generalmente para investigar blancos terapéuticos como enzimas y receptores hormonales de interés. Por otra parte los modelos no-roedores como los perros y los monos, son usados para evaluar el metabolismo y la toxicología de las moléculas candidatas. Entre estos últimos modelos de estudios, debido a su similitud anatómica [(analogía con el corazón, cavidad nasal, hígado, riñón y cerebro, así como con el sistema reproductivo y gastrointestinal), fisiológica y bioquímica con respecto al humano, el mini cerdo (por ejemplo, Göttingen, Bama o Yucatán)] son considerados como un excelente modelo para estudios pre-clínicos como los de farmacología y toxicología *in vivo*.¹¹ Después de un largo tiempo, la fase pre-clínica llega a su fin, con un estimado de uno a cinco compuestos candidatos seleccionados, de alrededor de 10,000 tamizados inicialmente. La FDA vigila la evaluación de la farmacología y toxicidad de las moléculas candidatas antes de pasar a la fase clínica, la cual le sigue a la fase pre-clínica.^{2,4,8}

1.4.2 Investigación clínica

Una vez que se han seleccionado los fármacos candidatos, se continúa con la fase clínica, en la que las moléculas elegidas son probadas en humanos, estudiándolas a conciencia para proporcionar evidencia de la seguridad y la eficacia del fármaco, antes que la FDA lo revise para su eventual aprobación para ser comercializado. Para poder cumplir con este propósito, los candidatos deben ser evaluados en diferentes tipos de ensayos clínicos, que en promedio tomarán alrededor de 6 a 7 años para su conclusión. Sin embargo, para poder iniciar con la fase clínica, ésta debe de justificarse ante la FDA, lo que se realiza aprobando una evaluación llamada: Investigación de aplicación y seguridad de un nuevo fármaco o (IND por sus siglas en inglés, Investigational New Drug Application and Safety). Esta evaluación, consiste en mostrar los resultados de los experimentos realizados en la fase pre-clínica, por ejemplo: la estructura química, la predicción de su comportamiento en el cuerpo humano, evidencia de algún efecto terapéutico y una lista de posibles efectos adversos presentados en modelos animales; todo esto con el fin de garantizar la seguridad de los voluntarios que participarían en los ensayos clínicos. Además, también proporciona información detallada de cómo se llevarán a cabo las pruebas clínicas, dónde se realizarán y quiénes serán los encargados de realizarlas. Aunado a esto, todos los ensayos clínicos deben incluir una carta de consentimiento informado de cada uno de los voluntarios incluidos en los estudios; además de que el protocolo debe de ser evaluado y aprobado por el Comité Ética de la

(s) institución (es) donde se realizará (n) la (s) prueba (s) clínica (s) (IRB, del inglés Institutional Review Board).⁴

Una vez aprobados estos requerimientos, los ensayos clínicos se realizan en etapas bien diferenciadas.

1.4.2.1 Estudios de fase clínica I

Son llevados a cabo con aproximadamente 20 a 100 voluntarios sanos, tienen el objetivo primordial de descubrir qué tan seguro es el medicamento de prueba (evaluación del metabolismo y eliminación del cuerpo, así como de las posibles reacciones adversas).

1.4.2.2 Estudios de fase clínica II

En esta fase se estudian cerca de 100 a 500 pacientes con una enfermedad o una condición particular, tienen el fin de determinar efectos adversos a corto plazo y si el medicamento funciona como se esperaba y mejora la condición clínica del paciente. En combinación, las fases clínicas I y II tienen la finalidad de proporcionar la certeza de seguridad y eficacia del fármaco evaluado, así como también proporcionar un rango de dosificación amplio.

1.4.2.3 Los estudios de fase clínica III

Posteriormente a los estudios de fase II, se continúan con los de fase III (estudios multicéntricos controlados), caracterizados por ser los de mayor escala (aproximadamente de 1,000 a 5,000 pacientes) y de mayor duración, en la cual se necesitan pruebas más apropiadas donde se emplean un rango de dosis razonable (curvas terapéuticas “concentración-respuesta”), así como también más controladas y donde se requiere un estricto criterio de selección de los pacientes (puntos de corte adecuados).^{2,4,8,12}

En esta etapa es necesario tener información acerca de la farmacocinética (evaluación del proceso de absorción, distribución, metabolismo y eliminación o ADME, de medicamentos en pacientes sometidos a alguna terapia farmacológica) y farmacodinamia (estudia la relación entre la concentración de un fármaco y la respuesta obtenida en un paciente)¹³ del producto en evaluación, por ejemplo: evidencia sobre los efectos en biomarcadores. Éstos, son elegidos fundamentalmente bajo la premisa de qué tan buenos son, para demostrar la eficacia terapéutica del producto en un lapso corto de tiempo y deben encontrarse aceptados como marcadores sustitutos de la eficacia, así como también debe ser bien conocida la relación dosis/exposición con respecto al producto. Para poder ser considerado un buen marcador farmacodinámico de predicción de la eficacia, éste debe ser sensible a cambios provocados por la terapia y a través de estos cambios poder explicar los diferentes tipos de resultados clínicos (por ejemplo,

niveles de colesterol sanguíneo, presión arterial, etc.). La finalidad de las pruebas de fase III, es poder identificar sub-grupos en la población estudiada con respuestas al tratamiento potencialmente mejores. Esta fase es clave en la aprobación del fármaco y ofrece las razones para agregar etiqueta de uso en base a pruebas farmacogenéticas (ver más adelante).^{4,8,12}

1.4.2.4 Estudios de fase clínica IV

Una vez que el medicamento es comercializado se inicia con la última fase de evaluación, las pruebas de fase clínica IV, las cuáles se caracterizan por un seguimiento del producto farmacéutico post-comercialización, donde se evalúa mediante cuestionarios la existencia de reacciones adversas o tóxicas tras el uso generalizado de dicho producto. Esta fase es mejor conocida como de farmacovigilancia.^{2,4}

1.4.2.5 Estudios de bioequivalencia

Una vez que la patente de un fármaco innovador ha vencido (en México la vigencia es de 10 años), otras compañías farmacéuticas pueden formular el mismo medicamento, estos fármacos son conocidos como genéricos intercambiables (GI). En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) obliga a los fabricantes de GI a tener un registro sanitario para poder comercializar su

producto. Este registro sanitario garantiza que los laboratorios que fabrican los fármacos genéricos cumplan con los mismos estándares de manufactura que el medicamento de referencia (original de patente).

Para obtener el registro sanitario, los laboratorios someten su producto GI a estudios de bioequivalencia, evaluando la equivalencia biológica (*in vivo*) de dos preparaciones de un medicamento hecho por dos fabricantes distintos, es decir, se espera que ambos sean, iguales para todos los propósitos terapéuticos. Estos medicamentos deben tener el mismo principio activo, la misma pureza y ser administrados por la misma vía, para denominarse bioequivalentes. Estos estudios son realizados en al menos 24 sujetos sanos según la NOM-177-SSA1-1998 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.¹⁴

CAPÍTULO 2

METABOLISMO DE FÁRMACOS Y SU VARIACIÓN

2.1 Biotransformación

La mayor parte de los fármacos son particularmente lipofílicos y por ende hidrofóbicos. Esta propiedad fisicoquímica les permite atravesar con facilidad las membranas celulares, hasta su destino final (sitio de acción farmacológica). No obstante, debido a que el cuerpo humano está constituido aproximadamente de un 80% de agua, el mismo carácter hidrófobo de los medicamentos entorpece su eliminación del cuerpo. Por lo que al acumularse y rebasar su concentración máxima segura en sangre (nivel supratrapéutico), producen toxicidad farmacológica. Para contener con este riesgo, nuestro cuerpo posee un repertorio enzimático capaz de biotransformar los fármacos.¹⁵ La superfamilia de isoenzimas de los citocromos hepáticos P450 o mejor conocidos

como CYP450, es la encargada de esta tarea. El metabolismo de los medicamentos se compone principalmente de dos fases: i) metabolismo de fase I (reacciones de óxido-reducción) que transforma el metabolito a una forma más activa o más soluble, y ii) metabolismo de fase II (reacciones de conjugación) que convierte primordialmente las moléculas hidrofóbicas a unas estructuras más hidrofílicas para facilitar su excreción. Las CYP450 por medio del metabolismo oxidativo, transforman alrededor del 80% de los medicamentos empleados en la clínica y aproximadamente el 50% de los fármacos eliminados (Figura 1).^{16,17}

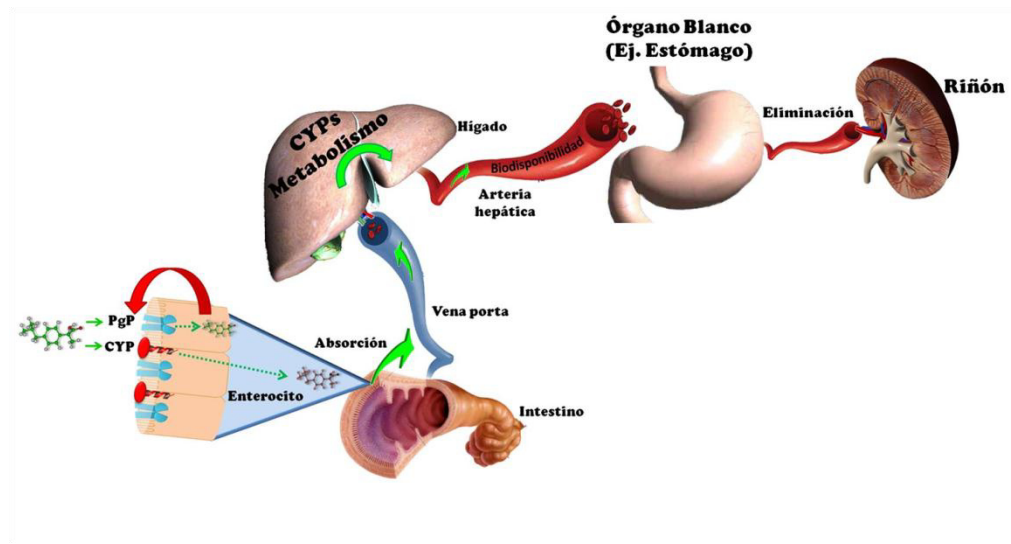


Figura 1. Metabolismo de los fármacos. Después de su administración, los fármacos: 1) Interaccionan con proteínas transportadoras y se absorben por los enterocitos. 2) Pasan a la circulación sanguínea por medio de la vía portal hepática. 3) Se metabolizan por las enzimas hepáticas de la familia Citocromo P450. 4) Son puestos a biodisponibilidad por medio de la arteria hepática. 5) Ejercen su efecto en el órgano blanco. 6) Son modificados por enzimas de metabolismo fase II en el hígado y finalmente eliminados por la vía renal.

2.2 Diferencias interindividuales del metabolismo de fármacos

Las diferencias interindividuales que existen en el metabolismo de medicamentos, son influenciadas por factores como la edad, el sexo, algunas enfermedades, el medio ambiente, la dieta e interacciones farmacológicas, así como también por el perfil genético de cada persona (variación genética).¹⁸ A pesar de que las compañías farmacéuticas comprueban la eficacia y seguridad de los medicamentos antes de ser puestos en el mercado, existe variabilidad interindividual en el metabolismo de fármacos y la respuesta a ellos, que es producto de la interacción de los factores antes mencionados. La discrepancia entre las concentraciones plasmáticas de dos sujetos física y fisiológicamente similares, a los que se les ha administrado la misma dosificación de cierto medicamento, puede ser más de 1000 veces.¹⁹ Ingelman-Sundberg dice que “los factores genéticos pueden representar entre el 20 y 40% de estas diferencias interindividuales en el metabolismo y respuesta a fármacos. Sin embargo, para ciertos medicamentos o clases de medicinas, los factores genéticos serán los más importantes para el resultado de la terapia farmacológica”.¹⁹

Polimorfismos genéticos (cambios en la secuencia de ADN presentes en una frecuencia mayor al 1%) en las secuencias codificantes de estas enzimas, determinan la respuesta que un individuo puede tener a un fármaco, pudiendo ésta ser, nula, reducida, normal o incluso aumentada.^{16,17}

2.3 Efectos variables de los fármacos

Cuando un principio activo ingresa al cuerpo de una persona, su metabolismo puede responder de diferentes maneras: ya sea que experimente una respuesta eficaz, que presente una respuesta disminuida, que simplemente no responda a la terapia o que exhiba alguna reacción adversa (ADR del inglés, adverse drug reaction). La toxicidad hepática y arritmias cardíacas son comunes en las reacciones adversas, que pueden llevar a una hospitalización e inclusive, a la muerte. Por lo tanto, las ADRs juegan un papel preponderante en la morbilidad y mortalidad de la población mundial, traducándose en la generación de costos considerables para los sistemas de salud.²⁰ En efecto, según el análisis realizado por Lazarou *et al* en 1998,²¹ se estima que las ADRs son responsables del 6.7% de los pacientes internados y del 0.13% de los decesos. Esto en hospitales de los Estados Unidos. Pirmohamed y colaboradores encontraron cifras similares en un trabajo que abarcó hospitales del Reino Unido.²² Por tal motivo, las ADRs continúan siendo las limitantes más grandes para que nuevos fármacos lleguen al mercado; igualmente, son la razón por la que un fármaco sea retirado de éste. Como consecuencia de lo anteriormente mencionado, los investigadores, los proveedores de asistencia médica, las agencias reguladoras como la FDA y la industria farmacéutica, han dirigido sus esfuerzos para identificar cuáles son los factores que determinan el riesgo de presentar ADRs.²³ Actualmente este equipo multidisciplinario se ha enfocado primordialmente en los factores genéticos, ya que estos son transcendentales en la

patogénesis y la predicción de ADRs. Al poder identificar estos factores, será fundamental en la terapéutica farmacológica, pues hará posible diseñar un tratamiento en base a un perfil genético individual, que no sólo resultará en una mejor respuesta, sino también en la reducción de manera importante del número de ADRs.²⁰

2.4 Genética y farmacología

El estudio de las variaciones en genes que influyen en el proceso ADME que experimentan los fármacos en el cuerpo humano, las cuales pueden ser determinantes en la respuesta de un individuo a una terapia farmacológica.¹³ Este proceso se puede dividir en dos partes principales: exposición y respuesta al medicamento. La exposición se enfoca principalmente en la administración de dosis, niveles plasmáticos de la medicina o en general en la farmacocinética, siguiendo las curvas de concentración. Por otro lado, la farmacodinamia se centra primordialmente en los efectos del fármaco a nivel sistémico, a través del monitoreo de su impacto en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, lo que incluye tanto valorar la eficacia terapéutica, como detectar ADRs.²⁰ La variación genética además de influir en la incidencia de las enfermedades, su progresión y recurrencia, también afectan su tratamiento, siendo responsable de la heterogeneidad de la respuesta a fármacos que puede existir entre dos individuos de la misma edad, talla y peso tratados con un mismo régimen farmacológico.²⁴ Es así que revelar la variación genética de cada individuo en genes que condicionan la magnitud de su proceso ADME, es determinante para la elección del medicamento o medicamentos

con más probabilidad de ofrecerle éxito terapéutico y a la vez advertirle de las probables reacciones adversas o tóxicas.⁸

CAPÍTULO 3

FARMACOGENÉTICA

3.1 De la genómica a la farmacogenética

El área científica que empezó a explicar el papel de la variación genética en el metabolismo de fármacos, tuvo su albor formalmente a finales de 1950.²⁵ En 1959 Friedrich Vogel, bautizó esta área de la investigación científica, como farmacogenética. Este terreno tuvo un lento crecimiento durante los siguientes años, debido, a que sólo en algunos medicamentos, la respuesta o la presencia de ADRs, se podía asociar a un solo gen.²⁶

Conforme la tecnología fue avanzando, en 1997 se propuso analizar, mediante un sistema de mapeo genómico (arreglos de oligonucleótidos en alta densidad), la

variabilidad genética de las vías relacionadas al metabolismo de fármacos, en paralelo con la de genes asociados a enfermedades.

Los términos farmacogenética y farmacogenómica²⁷ tienden a confundirse y aunque ambos estudian la variación en genes del metabolismo y respuesta a fármacos, son distintos entre sí. En sentido estricto, la farmacogenética se refiere a la identificación de las variantes, en el genoma, que afectan el metabolismo de los medicamentos. Por otra parte, la farmacogenómica se refiere al estudio de los mecanismos que explican dicho efecto de la variación genómica en la respuesta a los fármacos, recurriendo por ello a técnicas de la era genómica, como los ADNchips.¹³

Incluso desde antes de la conclusión oficial en el 2003 del PGH, se ha producido un avance exponencial en el terreno científico. Como consecuencia, se han desarrollado pruebas farmacogenéticas de acompañamiento como nuevos microarreglos de ADN (ADNchips), que predicen la respuesta a tratamientos farmacológicos. Particularmente la farmacogenética está revolucionando la forma de prescribir un medicamento, en base a revelar desde el genoma la capacidad de cada individuo de responder de manera eficaz o adversa (ADRs) a los fármacos (medicina personalizada).²⁸

Tener un panorama general de los factores genéticos, los métodos y estrategias actuales para la identificación de estos, permitirá una mejor comprensión de los alcances de la farmacogenética, en la predicción de la respuesta a terapias farmacológicas.

3.2 Variación genética y genómica

Las diferencias genéticas que existen entre las diferentes poblaciones e incluso entre individuos de una misma población, van desde polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs, repeticiones de secuencias cortas en tándem STRs (del inglés short tandem repeat), hasta variación del número de copias de un gen (CNVs, del inglés copy number variation) e inserciones y deleciones (indels).²⁹⁻³¹ Estas diferencias genéticas que son de mayor relevancia en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos, se presentan en tres categorías principales de genes: 1) aquellos con relevancia farmacocinética (ADME), 2) los que codifican para blancos premeditados y no premeditados del medicamento (efecto farmacológico),⁸ 3) también los considerados como marcadores pronósticos; es decir genes que predicen la incidencia o desarrollo de una enfermedad (probabilidad de cáncer o metástasis, por ejemplo en el oncogen K-ras para el cáncer de colon).³²

En la actualidad, las diferencias genéticas asociadas a los efectos farmacocinéticos son mejor conocidas y más numerosas que las asociadas a los efectos farmacodinámicos. Asociar los perfiles genéticos con los parámetros farmacocinéticos que presentan diferencias entre individuos resulta más sencillo de medir, pues se refleja en las concentraciones del medicamento y en los niveles de su (s) metabolito (s) en los fluidos biológicos del cuerpo, en función del tiempo; algunos de dichos parámetros son: el área bajo la curva (AUC), la concentración máxima (C_{\max}) y el tiempo para C_{\max}

(T_{max}), el aclaramiento, el volumen de distribución y la vida media. Por otra parte, el impacto de los factores genéticos que repercuten en la farmacodinamia es más complicado de evaluar, porque los efectos clínicos presentan más variación entre los individuos y son más propensos a imprecisión en las mediciones, además de que son influenciados por varios factores. En conclusión, los factores genéticos afectan tanto la farmacocinética como la farmacodinamia, repercutiendo en la respuesta a algún régimen terapéutico dado. De esta manera, la determinación de la variación genética temprana en voluntarios o pacientes en tratamientos farmacológicos experimentales (protocolos clínicos), es relevante para poder definir si alguna es clínicamente importante.⁸

3.3 La importancia de la farmacogenética

La mayor cantidad de información farmacogenética existente se ha generado post-comercialización, sin embargo la importancia de ésta, afirma el valor potencial de tener acceso a estos datos de manera más temprana cuando pueden ser asociados a los ensayos clínicos en las distintas fases, para aumentar la seguridad y la eficacia.

El valor de la farmacogenética lo ilustra el creciente número de ejemplos de fármacos en los cuales se incluyen etiquetas de uso de pruebas farmacogenéticas para guiar su prescripción. La FDA tiene una lista de fármacos en los cuales se incluye la etiqueta de uso de pruebas farmacogenéticas antes de su prescripción, siendo el ejemplo más conocido el de la Warfarina, medicamento empleado para la prevención y

tratamiento de eventos tromboembólicos (genotipificación de interés: alelos de los genes *CYP2C19* y *VKORC1*).^{8,33,34}

Otro fármaco que incluye esta etiqueta es el Clopidogrel, medicamento utilizado para el tratamiento de eventos aterotrombóticos y cardiacos (genotipificación de interés: alelos del gen *CYP2C19*).³⁵

En dicha lista no sólo se incluyen fármacos que pueden presentar efectos adversos en base a su relación dosis-respuesta, sino que también la conforman medicamentos en los cuáles se puede presentar una respuesta exacerbada; es decir fármacos asociados a genotipo específicos de alto riesgo como el Abacavir, utilizado en la terapias contra el VIH (genotipificación de importancia: alelo génico *HLA-B*5701*), donde la presencia de una variación génica está asociada con una mayor hipersensibilidad al medicamento;³⁶ otro grupo de medicamentos que contienen esta etiqueta, son los antineoplásicos como el Tamoxifeno, utilizado en la terapia de pacientes con cáncer de mama (genotipificación de importancia: alelos de los genes *CYP2D6*, *CYP3A5* y *SULT1A1*), así como también el medicamento 6-mercaptopurina, comúnmente empleado en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (genotipificación de interés: alelos del gen *TPMT*), entre otros.^{33,34}

Además de estos ejemplos, hoy en día existen bases de datos que contienen información sobre las diferentes enzimas responsables del metabolismo de xenobióticos, como lo son los medicamentos. Estas bases de datos contienen información acerca de los fármacos que son metabolizados por dicha clase de enzimas, siendo buenos ejemplos los disponibles en los siguientes sitios de la web: <http://bioinformatics.charite.de/supercyp> y

<http://medicine.iupui.edu/clinpharm/DDIs/>. Por lo tanto, si una persona dispone de su perfil genómico, puede acceder libremente y consultar en base a su genotipo-fenotipo enzimático, cuáles son los medicamentos que le pueden ofrecer una mejor respuesta o identificar a cuáles tiene un riesgo elevado de sufrir reacciones adversas, o simplemente poder seleccionar otra alternativa terapéutica. Estas herramientas pueden resultar también en una ayuda invaluable para los médicos, al momento de prescribir un fármaco o la dosis de éste.

3.4 Pruebas farmacogenéticas de acompañamiento

El incluir investigación farmacogenética en el desarrollo de nuevos fármacos, favorece la identificación de las variaciones genómicas interindividuales asociadas a la eficacia y seguridad exhibidas por los fármacos experimentales. La farmacogenética necesita de la colección y empleo de muestras biológicas, para generar datos. En el desarrollo de nuevos fármacos estos datos pueden ser usados para: 1) identificar las razones de las diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas (variabilidad en la respuesta clínica), 2) priorizar el diseño y empleo de estudios de interacción fármaco-fármaco, 3) diseñar ensayos clínicos que permitan evaluar los efectos en subgrupos identificados (distintos tipos de metabolismo) y 4) revelar las bases moleculares de estas diferencias, así como la ausencia de eficacia o la presencia de eventos adversos.

Estas pruebas farmacogenéticas pueden ser diagnósticas cuando son utilizadas para diferenciar a los individuos: 1) con mayor probabilidad de éxito terapéutico, 2) que

son propensos o tienen un riesgo mayor de presentar reacciones adversas provocadas por el medicamento, 3) que no obtienen algún beneficio del tratamiento, y 4) que necesitan de una dosis genotipo específico o de intervalos de medicación.

Además de lo anteriormente mencionado, el incluir estudios farmacogenómicos en la fase de investigación clínica III permite:

- 1) Identificar y seleccionar poblaciones que requieren de una dosis mínimas o máximas.
- 2) Identificar y seleccionar poblaciones que responden a un tratamiento estándar, en función de sus características fenotípicas y genotípicas.
- 3) Definir un rango de dosis para pruebas posteriores.
- 4) Determinar cuáles son los grupos de alto riesgo, es decir los más propensos a experimentar severas reacciones adversas (figura 2).

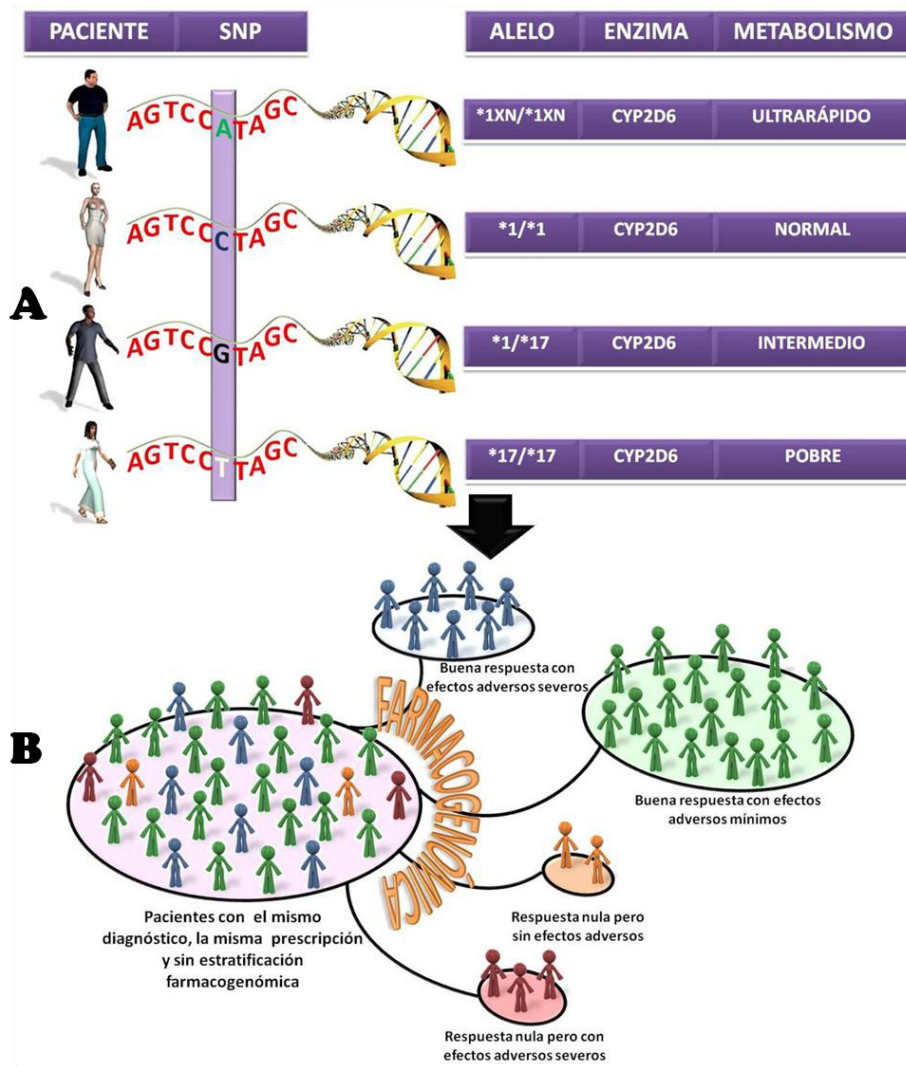


Figura 2. Variabilidad Genética-Fenotipo-Farmacogenética. A) El fenotipo (tipo de metabolizador) está ligado a la variabilidad genotípica de los individuos. Se han identificado diferentes alelos distinguibles por polimorfismos de un sólo nucleótido o SNPs en un mismo gen, que afectan de distintas maneras el metabolismo de fármacos. B) Utilizando herramientas farmacogenéticas para rastrear estos SNPs, se puede distinguir de entre un grupo de personas con un mismo diagnóstico, prescripción y tratamiento farmacológico, a aquellos que responderán, de los que no y a aquellos que presentarán efectos adversos. Modificado de Kudzma y cols.³⁷

La identificación de los distintos grupos de una población en estudio, permite un abordaje terapéutico individualizado (por ejemplo para pacientes con cáncer), al predecir la respuesta al tratamiento por medio de biomarcadores predictivos y el perfil genómico, haciendo más dinámica la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos.⁸

3.4.1 Estudios de farmacogenética clínica

Los estudios de farmacología clínica representan una ventana de oportunidad para integrar la farmacogenética y así evaluar la variabilidad interindividual y sus repercusiones en los estudios clínicos subsecuentes. En la actualidad son pocos los estudios que involucran una selección de sujetos en base a su perfil genómico o en base a un genotipo específico a fin de estratificar en grupos de tratamiento específicos. La farmacogenética puede ser incluida en estudios:

1) De farmacocinética y farmacodinamia en voluntarios sanos. Si el fármaco en cuestión es metabolizado por una enzima codificada por un gen polimórfico cuyos genotipos más frecuentes deben de ser $\geq 1\%$ para determinar el grado de variabilidad y diferencias máximas de la exposición sistémica entre genotipos.

2) Estudios de farmacocinética y farmacodinamia en pacientes. Para seleccionar pacientes en base a genotipos para identificar los respondedores potenciales y así eliminar los pacientes con probabilidad de experimentar algún efecto tóxico.

3) Estudios de dosis respuesta. En los que se monitorean biomarcadores o signos clínicos relevantes de la eficacia y seguridad terapéutica, a fin de determinar dosis más adecuadas, así como también para establecer el rango de dosis a la cual se presentan efectos adversos.⁸

3.4.2 La farmacogenética en la investigación clínica

En los estudios farmacogenómicos involucrados en los protocolos clínicos de investigación de farmacocinética y farmacodinamia, se pone especial atención en los efectos de género, edad, talla y grupo étnico. Sin embargo, además de estas características demográficas de la población en estudio, hay ciertas consideraciones de seguridad que se deben de tener en cuenta, como lo son: el uso de voluntarios sanos en evaluaciones donde el medicamento no pone en riesgo la salud del sujeto estudiado (como sí ocurre en el caso de los antineoplásicos que son citotóxicos) y en contraparte, el uso de pacientes para quienes el fármaco experimental puede representar una oportunidad de explorar la farmacodinamia o ciertos puntos clínicos que no pueden ser medibles en los voluntarios sanos.⁸

3.4.3 Dispositivos diagnósticos farmacogenéticos

En esta era genómica, varias compañías manufacturan pruebas que determinan el perfil genético de pacientes por medio de Chips de ADN. La primera prueba de este tipo que estuvo lista para uso clínico, fue el “AmpliChip CYP450 test” de Roche, que salió al mercado en los EUA en el 2005. Usando la tecnología de chip o microarreglo de ADN (por lo general una laminilla de microscopio portando decenas o cientos de miles de sondas oligonucleotídicas con las que se hace reaccionar el genoma de un individuo para rastrearle a cada paciente mutaciones y polimorfismos), la prueba ofrece un reporte indicando las variaciones genéticas en *CYP2D6* y *CYP2C19* que están presentes y con ello se predice si se trata de un paciente metabolizador lento, intermedio, normal, o ultrarrápido de los sustratos para cada una de las enzimas. Esto ayuda a determinar el metabolismo involucrado en aproximadamente 25% de los fármacos prescritos.³⁷ Otro chip que ya también se encuentra en el mercado es el DMET (drug metabolism enzymes and transporters) panel chip de Affymetrix, diseñado para su uso en investigación y que evalúa polimorfismos en *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* y *CYP3A4*, 5, 7 y transportadores.^{38,39}

Por otra parte, un ADNchip versátil diseñado tanto para diagnóstico como para investigación es el PHARMACHip de la empresa española Progenika Biopharma S.A., el cual permite la identificación de 85 de los polimorfismos farmacogenéticos más relevantes y mejor caracterizados en la literatura científica internacional, con una

sensibilidad y especificidad superiores al 99.9%. El PHARMAChip detecta polimorfismos en una decena de genes de los Citocromos CYP450 y otros 25 genes implicados en la metabolización y transporte de fármacos. Esta prueba también proporciona un reporte en el cuál se predice el fenotipo metabolizador en el paciente para cada uno de los genotipos revelados, permitiendo con ello hacer recomendaciones del tipo y dosis de medicamentos con los que mejor se trataría la enfermedad de un determinado paciente, pasando así del análisis genético molecular a la era de la farmacogenética con bioanálisis genómicos de medicina personalizada.⁴⁰ Hasta el momento, esta tecnología se ha empleado en diversas investigaciones para evaluar simultáneamente diversos genes y marcadores.

3.5 Justificación

Los factores hereditarios contribuyen hasta en un 30% de la variación interindividual en el metabolismo de fármacos.

Los genes que se han visto asociados a esta variabilidad, son aquellos de cuyos productos depende el proceso ADME.

La farmacogenética permite revelar la variación génica que condicionan la eficacia y toxicidad con la que cada individuo responde a los fármacos.

Dada la alta demanda en México de estudios de bioequivalencia para la aprobación de fármacos genéricos, es importante valorar la aplicación de la farmacogenética para una mejor selección de voluntarios.

3.6 Hipótesis

La identificación de polimorfismos génicos característicos de nuestra población, en genes que intervienen en el metabolismo y transporte de fármacos mismos que presentarán una distribución diferente a la de otras poblaciones, permitirá una mejor predicción de fenotipo (tipos de metabolizadores) de los voluntarios incluidos en nuestro país, en protocolos de bioequivalencia para medicamentos de alta variabilidad farmacocinética.

3.7 Objetivos

3.7.1 Objetivo general

Determinar las variantes génicas que en individuos del NE de México que participan como voluntarios en estudios de bioequivalencia, influyan en el metabolismo de fármacos de alta variabilidad farmacocinética.

3.7.2 Objetivos específicos

1. Identificar estudios de bioequivalencia para fármacos de alta variabilidad farmacocinética y a partir de los voluntarios participantes:
 - a. Generar una base de datos con la información demográfica y clínica de los sujetos voluntarios.
 - b. Extraer ADN genómico a partir de sangre periférica de los sujetos y resguardarlo en el Biobanco de la Unidad de Biotecnología Médica, del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UANL.
2. Clasificar el tipo de metabolismo (fenotipos) de cada individuo, mediante el análisis de los perfiles farmacocinéticos obtenidos de estudios de bioequivalencia para fármacos de alta variabilidad.
3. Determinar en el ADN genómico de los voluntarios, las frecuencias alélicas y genotípicas de 87 polimorfismos en 36 genes con potencial impacto en el metabolismo de fármacos.
4. Analizar la posible asociación entre los genotipos de cada uno de los genes evaluados y los fenotipos metabolizadores.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Modelo experimental

La atorvastatina (ATV) es un medicamento comúnmente empleado en el tratamiento de la hipercolesterolemia, factor predisponente para desarrollar aterosclerosis. La ATV actúa inhibiendo la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima esencial en la biosíntesis de colesterol, al catalizar la conversión de HMG-CoA a mevalonato, precursor de esteroides como el colesterol. El uso de la ATV disminuye el riesgo de aterosclerosis, al reducir los niveles de lipoproteínas de baja densidad unidas a colesterol (C-LDL).⁴¹ Este fármaco, es administrado vía oral, como una sal de calcio (forma ácida) y el rango de dosis estándar oscila entre 10 y 80 mg/día. Una vez que la ATV es ingerida, en su metabolismo

participan varias enzimas. Entre las más importantes se encuentra la derivada del gen *CYP3A4* y que se encarga de transformar la ATV a su forma lactona (farmacológicamente inactiva) y posteriormente en dos metabolitos farmacológicamente activos (2-hidroxi-atorvastatina y 4-hidroxi-atorvastatina).^{42,43} Después, la ATV y sus metabolitos secundarios, son glucuronizados por acción de las enzimas uridin difosfoglucuronosil transferasas (*UGT1A1* y *UGT1A3*).⁴⁴ Además de estas enzimas del metabolismo fase I y II, respectivamente, existen proteínas transportadoras que también intervienen en el metabolismo de ATV, como lo son: la glicoproteína P producto del gen *MDR1* (*ABCB1*), el polipéptido-transportador de aniones orgánicos (*OATP1B1* y *OATP1B3*) codificados por los genes *SCLO1B1* y *SCLO1B3*⁴⁵⁻⁴⁷ y la proteína de resistencia al cáncer (*BCRP2*), producto del gen *ABCG2* (figura 3).^{48,49}

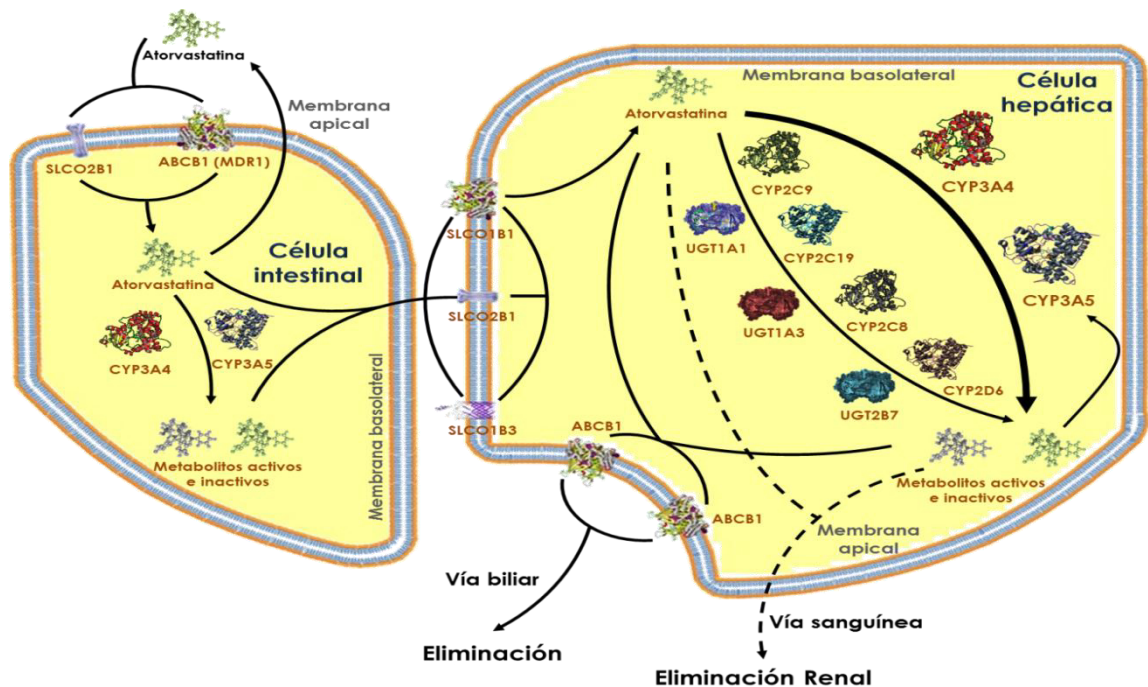


Figura 3. Vías metabólicas de las estatinas. Las estatinas ingresan a la circulación sanguínea a través de las células intestinales por medio de un transporte pasivo y activo vía la familia de los transportadores *ABC* y *SLC*. Los órganos principales

en el metabolismo y eliminación de las estatinas son el hígado y en menor grado el riñón. El metabolismo es catalizado por enzimas de las familias génicas *CYP* y *UGT*, siendo la principal vía de eliminación por el transportador *ABC*.

La farmacocinética de ATV presenta alta variabilidad interindividual de hasta seis veces.⁵⁰ Esta discrepancia farmacocinética revela variaciones del proceso ADME, que experimenta un fármaco durante su paso por el cuerpo humano.⁵¹ Factores como la edad, sexo, grupo étnico y la variabilidad genética intervienen en dichas diferencias interindividuales.^{13,52} Los factores genéticos, son responsables de alrededor del 15 al 30% de la variación interindividual del metabolismo, así como también de la respuesta a cierta clase de fármacos. Sin embargo, en algunos medicamentos este porcentaje puede aumentar hasta un 95%.²⁰

4.2 Validación del método de cuantificación

A partir de un estándar de ATV Cálctica (USP), se prepararon las curvas y controles partiendo de un stock de 1µg/mL con Metanol grado HPLC (Fermont) y H₂O al 50%. Para preparar los estándares, partiendo del stock se realizaron diluciones en plasma blanco (sin ATV) para igualar la matriz biológica en la cual se cuantifica el metabolito a 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, y 0.5 ng/mL. De igual manera se prepararon los controles a concentraciones de 75, 35, 7.5, y 1.7 ng/mL.

El método fue validado usando las curvas y controles previamente preparados para determinar los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión y exactitud, estabilidad (en función del tiempo, en función de ciclos de congelación y descongelación), influencia de hemólisis y muestras quilosas en la determinación de ATV, estabilidad en el auto-muestreador, recobro y tolerancia.

Los niveles plasmáticos de ATV cálcica fueron medidos a través de cromatografía de alta resolución y espectrometría de masas en tándem (HPLC/MS/MS) Agilent 1100 equipado con auto-muestreador, bomba binaria y triple cuadrupolo (MS/MS) Agilent 6410 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se utilizó una pre-columna C18 y una columna C18 Synergi™ 4µm Fusion-RP 80 Å LC 50 x 2 mm de (Phenomenex, Torrance, CA). Las muestras de plasma fueron descongeladas cuidadosamente (100 µL) y después las proteínas fueron precipitadas agregando acetonitrilo (400 µL). Luego se agitaron en vórtex por 4 min a 70 rpm. Posteriormente fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 min a 10 °C, 300 µL del sobrenadante fueron colocados en un vial y llevados al sistema cromatográfico para su análisis. Las muestras inyectadas fueron eluidas con la fase móvil consistente de: A) agua con 0.1% de ácido fórmico, B) acetonitrilo (30:70). La temperatura de la columna fue de 40 °C y un flujo de 0.4 mL/min, la temperatura del auto-muestreador fue de 20 °C. El volumen de inyección fue de 5 µL, y la detección fue llevada a cabo usando un detector MS/MS ESI ión precursor (+) 559.3 m/z y ión producto (+) 440.3 m/z.

4.3 Sujetos de estudio

Fueron reclutados 498 voluntarios sanos del noreste de México y 60 fueron seleccionados para este estudio piloto. Los criterios de inclusión fueron: hombres de 18 a 45 años, peso ≥ 50 Kg, disposición para completar el estudio, seronegatividad para VIH, VHC y VHB, índice de masa corporal (IMC) de 20 a 26 Kg/m², valores normales en los resultados de laboratorio (biometría hemática, química sanguínea, pruebas funcionales hepáticas y examen general de orina). Fueron excluidos del estudio aquellos que presentaran condiciones médicas inadecuadas, anormalidades en los resultados de laboratorio, así como también los que fueran discordantes con la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. El Comité de investigación de Ipharma S. A. de C. V., aprobaron el protocolo (Atorvastatina/A95-10Bis). Se obtuvo la firma del Consentimiento Informado de todos los voluntarios incluidos en el presente estudio.

4.4 Obtención de los perfiles farmacocinéticos

Después de un ayuno de 10 h en la clínica (Ipharma S. A. de C. V.), a cada sujeto se les administró una sola dosis de 80 mg de ATV cálcica [R-(R*, R*)]-2-(4-fluorofenil)- β , δ -dihidroxi-5-(1-metiletil)-3-fenil-4-[(fenilamino) carbonil]-1H-pirrol-1-ácido hepatónico, sal de calcio (2:1) trihidratado adquirido de Pfizer Pharmaceuticals

LLC (Caguas, PR). Se obtuvieron 4 mL de sangre venosa antes de la administración de ATV (tiempo 0.0) y después de administrado el medicamento a cada voluntario se les tomaron 17 muestras de sangre a los siguientes tiempos: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 36.0 y 48.0 h a cada uno de los sujetos de estudio. Las muestras fueron colectadas en K₂ EDTA Vacutainers de BD Diagnostics (Franklin Lakes, NJ). El plasma fue separado por centrifugación (15 min a 2,800 rpm a 4°C) y resguardado en crioviales a -80°C hasta su posterior análisis, usando el método validado por Ipharma S. A. de C. V.^{42,53,54} Durante la corrida de las muestras, se evaluó la linealidad interdía realizando curvas de calibración de 0.5 a 100 ng/mL (0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 y 100), así mismo se evaluó el control de calidad intradía utilizando controles de (1.7, 7.5, 50.0 y 75.0 ng/mL) cada 8 muestras.

4.5 Análisis de los perfiles farmacocinéticos

El software PK/PD de modelado no lineal WinNonlin 5.3 (Pharsight Corp., Mountain View, CA) fue utilizado para el análisis farmacocinético. La concentración máxima en plasma (C_{\max}) y el tiempo establecido para alcanzar C_{\max} (T_{\max}), fueron calculados de los datos concentración-tiempo observados en los niveles plasmáticos. Los parámetros farmacocinéticos se estimaron a partir de un método no compartimental después de la administración oral de una sola dosis de ATV y fueron los siguientes: el área bajo la curva de la concentración plasmática desde el tiempo 0 al tiempo de la última determinación (AUC_{0-t}) calculado usando la regla trapezoidal lineal-logarítmica:

el área bajo la curva de 0 a infinito ($AUC_{0-\infty}$), aclaramiento sobre la fracción de la dosis absorbida (Cl/F), volumen de distribución sobre la fracción de la dosis absorbida (Vd/F), constante de eliminación en la fase terminal (K_e) y vida media en la fase terminal del fármaco ($T_{1/2}$).

4.6 Clasificación metabólica

Para la clasificar el metabolismo, se realizó un análisis de clusters a partir del criterio de la distancia de Manhattan y el método jerárquico de Ward, usando el software Minitab 16 demo (Minitab Inc., StateCollege, PA), en base a la combinación de los parámetros AUC_{0-t} y C_{max} .

4.7 Obtención del ADN

Del paquete celular remanente, se extrajo ADN genómico a través del método lisis alcalina para células eucariotas,⁵⁵ se evaluó su integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente fue cuantificado usando el NanoDrop 2000C (Thermo Scientific). La calidad fue evaluada por amplificación por medio de PCR en tiempo real para el gen de referencia del colágeno tipo 7 (*COL 7A*) usando sondas TaqMan y oligos específicos (Applied Biosystems, Foster City, California). En el caso de los 60 voluntarios del protocolo de ATV se evaluó la calidad

por medio de PCR de punto final, amplificando un fragmento de 1500 pb del gen de referencia de la hormona de crecimiento (GH). A partir del DNA extraído se determinaron los polimorfismos en los genes relacionados con el metabolismo de fármacos, por medio del PHARMAchip de Progénika Biopharma S. A. (Derio, Bilbao, España).

4.7.1 Genotipificación de polimorfismos

Después de la obtención del ADN genómico de cada uno de los voluntarios, las muestras fueron amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, en siete reacciones múltiplex, siguiendo el protocolo validado por el fabricante.⁴⁰ El tamizaje de polimorfismos se realizó, usando el microarreglo PHARMAchip (Progénika, Derio, Bilbao, España). Este dispositivo permitió el rastreo simultáneo con sondas oligonucleotídicas de 85 polimorfismos génicos en 34 genes que intervienen en el metabolismo y respuesta a fármacos, con una sensibilidad y especificidad de más del 99.9%. Se evaluaron genes de la familia de los Citocromos P450, así como también genes involucrados en el metabolismo de fase II, transportadores y receptores (cuadro 1). Los productos amplificados, fueron fraccionados con enzimas de restricción, seguido de su marcaje fluorescente e hibridización al microarreglo, en la plataforma automatizada TECAN HS4800PRO (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ). Por último, el microarreglo fue revelado empleando el escáner Innoscan 710 (Innopsys S. A., Carbonne, FR). Las variantes polimórficas fueron determinadas mediante el software

PHARMAchip V.3.2.9.22 Los marcadores Rs2231142 (C__15854163_70) y Rs4149056 (C__30633906_10) en los genes *ABCG2* y *SLCO1B1*, respectivamente, fueron analizados usando el método validado para ensayos de genotipificación (Applied Biosystems, Foster City, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Cuadro 1. Lista de genes y polimorfismos que analiza el PHARMAchip.

CYP-Fase I		Fase II		Transportadores		Receptores		Otros	
Gen	Polimorfismos	Gen	Polimorfismos	Gen	SNP	Gen	SNPs	Gen	Polimorfismos
<i>CYP1A1</i>	Ile462Val	<i>GSTM1</i>	Presente/Nulo	<i>MDR1</i>	C3435T	<i>ADRB1</i>	Arg389Gly	<i>ADD1</i>	Gly460Trp
<i>CYP1A2</i>	*1,*1C,*1F, *7, *11	<i>GSTM3</i>	*A, *B			<i>ADRB2</i>	Arg16Gly	<i>AGT</i>	Met235Thr
							Gln27Glu		
<i>CYP2B6</i>	G516T	<i>GSTP1</i>	*Ile, *Val			<i>AGTR1</i>	A1166C	<i>CHE</i>	Asp70Gly
									Ala539Thr
<i>CYP2C19</i>	*1, *2, *3, *4, *5, *7, *8, *9, *10	<i>GSTT1</i>	Presente/Nulo			<i>BDKRB2</i>	C-58T	<i>COMT</i>	Val108Met
<i>CYP2C8</i>	*1, *2, *3, *4	<i>NAT2</i>	*4, *5B, *5C, *6A, 7B, *12A, *12B, *13, *14A, *14B,			<i>DRD3</i>	Ser9Gly	<i>DPYD</i>	IVS14+1G>A
<i>CYP2C9</i>	*1, *2, *3, *4, *5, *6	<i>TPMT</i>	*1, *2, *3A, *3B, *3C, *3D			<i>GRIN2B</i>	C2664T	<i>ERCC2</i>	Lys751Gln
<i>CYP2D6</i>	*1, *2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14A, *14B, *15, *17, *19, *20, *25, *26, *29, *30, *31, *35, *40, *41, *1XN, *2XN, *4XN, *10XN, *17XN, *35XN, *41XN, Duplicación y Delección					<i>HTR2A</i>	His452Tyr, T102C	<i>IL10</i>	G-1082 ^a
<i>CYP3A4</i>	*1, *1B							<i>MTHFR</i>	C677T
<i>CYP3A5</i>	*1, *3, *6, *8, *9, *10							<i>TNFA</i>	G-308 ^a
								<i>TYMS</i>	Delección 3'-UTR 6pb
								<i>VKORC1</i>	G-1639 ^a

4.8 Análisis estadístico para determinar posibles asociaciones entre fenotipos y genotipos

La asociación entre los tres fenotipos metabolizadores y los tres posibles genotipos para cada gen fue calculada usando la prueba exacta de Fisher. Para evaluar la posible asociación de los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos [C_{\max} (ng/mL), AUC_{0-t} (ng/mL*h), $AUC_{0-\infty}$ (ng/mL*h) y Cl/F (L*h)] con cada genotipo, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. El paquete estadístico SPSS V. 20 (IBM Corp., Armonk, NY) fue usado para determinar la asociación. Un valor de p menor a 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Identificación de protocolos de fármacos de alta variabilidad farmacocinética

De los protocolos de bioequivalencia realizados en Ipharma S. A. de C. V., se obtuvieron 498 muestras de ADN correspondientes a 13 estudios de bioequivalencia y fue calculado el coeficiente de variación (%CV) interindividuo para cada uno de los estudios. En el cuadro 2 se resumen los resultados obtenidos.

Cuadro 2. Identificación de los protocolos de fármacos de alta variabilidad farmacocinética.

Fármaco	% CV	N
Atorvastatina	39	60
Simvastatina	18	20
Carbamazepina	11	28
ATV/L-Carnitina	44	40
Tramadol	19	28
ATV/Ácido Fenofibrico	43/27	32
Ketoprofeno	19	34
Lamivudina/Zidovudina	23/17	53
Ibuprofeno	12	28
Telmisartán	35	52
Valsartán	58	48
Clortalidona/Atenolol	25/28	24
Telmisartán	33	51
% de CV calculado		N total = 498

En el cuadro 2 se puede observar los fármacos analizados en cada estudio y el % de CV interindividuo, el cual para medicamentos de alta variabilidad farmacocinética este tiene que ser mayor al 30%, también se observa la N por cada estudio. Cabe mencionar que los fármacos que más alta variabilidad farmacocinética presentaron son los anti-hipertensivos como el Telmisartán (35 y 33 % de CV), Valsartán (58 % de CV), así como también las estatinas utilizadas en el tratamiento de las dislipidemias tales como Atorvastatina (39, 44 y 43 % de CV). Esto es evidente en la cantidad de sujetos reclutados para el estudio de estos fármacos, que resultaron los de mayor N.

A partir de los voluntarios participantes se obtuvieron muestras de ADN de cada uno de ellos, a las cuales se les evaluó la calidad mediante su cuantificación y amplificación del gen de referencia *COL7A* para la búsqueda de la mutación INSG2470, mediante un ensayo de discriminación alélica. En el cuadro 3 se muestran los valores promedio de las 498 muestras cuantificadas.

Cuadro 3. Parámetros de calidad del ADN extraído.

N = 498	[ng/μL]	ADN Total	260/280	260/230	R/mL (3mL de sangre)
	750.00	125.84 μg	1.92	2.630	41.62 μg
DE	155.95	23.4	0.090	0.173	9.2

El valor promedio de la relación 260/280 fue de 1.92, valor cercano a 2, lo que indica una buena calidad en las muestras con respecto a la cantidad de proteínas o contaminación con solventes orgánicos. Así mismo, la relación 260/230 se encontraba entre 2 y 3 lo que indicó una buena calidad con respecto a la presencia de ARN en la muestra.

Para evaluar la calidad, se amplificó el gen de referencia *COL 7A* mediante PCR en tiempo real buscando la mutación INSG2470 en un ensayo de discriminación alélica. Los resultados se pueden observar en la figura 4.

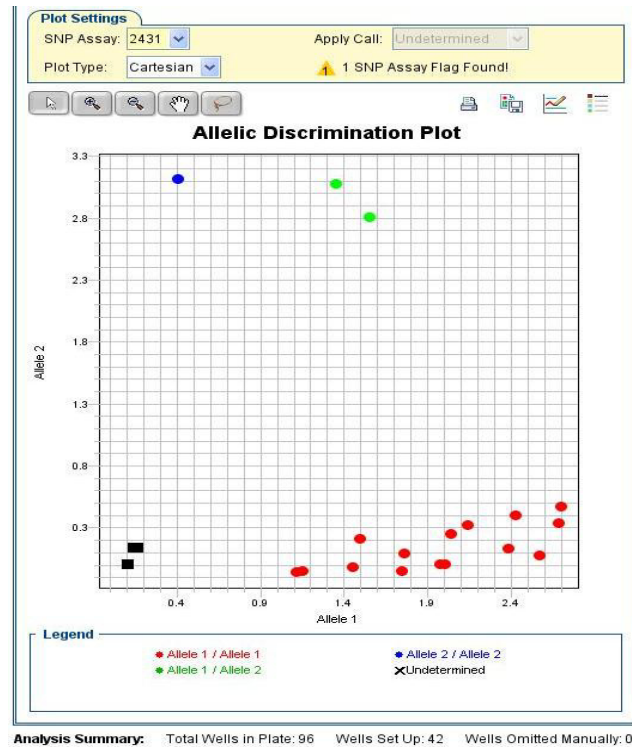


Figura 4. Plot de discriminación alélica para la mutación INSG2470 en el gen de *COL7A*.

Imagen de un plot de discriminación alélica donde se puede observar la señal proporcionada por marcadores fluorescentes, indicando que las muestras fueron amplificables usando un total de 20 ng/μL de ADN.

A partir de ahora se mostrarán los resultados obtenidos para nuestro modelo experimental Atorvastatina (ATV).

En el protocolo para ATV fueron incluidos 60 voluntarios sanos, los datos demográficos promedio son mostrados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Datos demográficos de los voluntarios del protocolo de ATV.

DATOS DEMOGRÁFICOS DE LOS VOLUNTARIOS							
	N	IMC ² (Kg/m ²)	S. C. ² (m ²)	Edad	Peso	Estatura	Sexo
Promedio	60	23.43	1.84	24.01	70.58	1.73	M
DE		1.64	0.131	4.35	8.24	0.065	

Los valores promedio para índice de masa corporal (IMC), superficie corporal (SC), edad, peso, estatura y el sexo de los sujetos de estudio son similares entre los sujetos esto lo podemos asumir observando los valores de la desviación estándar (DE).

De los voluntarios incluidos en este estudio piloto el 83% son originarios del estado de Nuevo León y la mayoría de ellos de ocupación estudiante (73%) como se muestra en la figura 5.

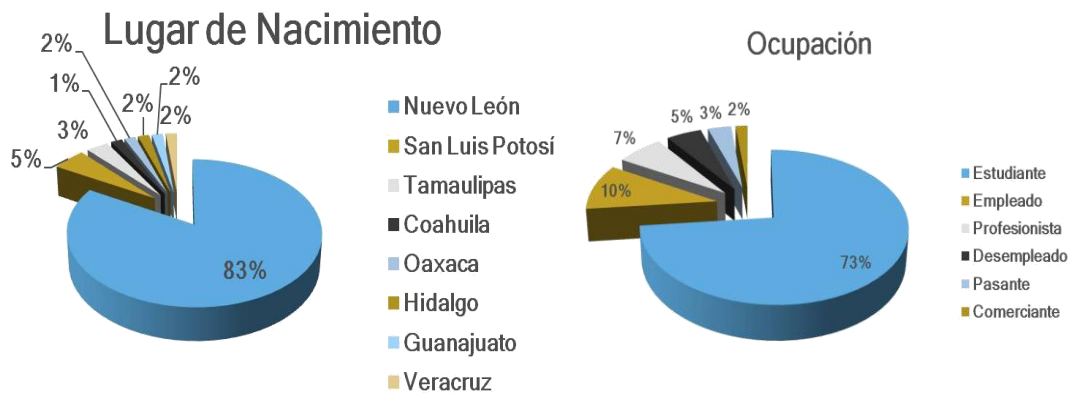


Figura 5. Origen y ocupación de los voluntarios del protocolo de ATV.

De cada uno de los participantes se obtuvieron muestras de sangre de las cuales se les extrajo el ADN. Este fue cuantificado y los resultados se muestran en el cuadro 5. El ADN fue evaluado en su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (figura 6) y su calidad amplificando el gen de referencia de la hormona del crecimiento (GH), figura 7.

Cuadro 5. Valores promedio de los parámetros de calidad del ADN.

N = 60	[ng/ μ L]	ADN Total	260/280	260/230	R/mL (3mL de sangre)
	852.00	144.84 μ g	1.99	2.68	48.28 μ g
DE	105.95	18.7	0.082	0.1625	8.3

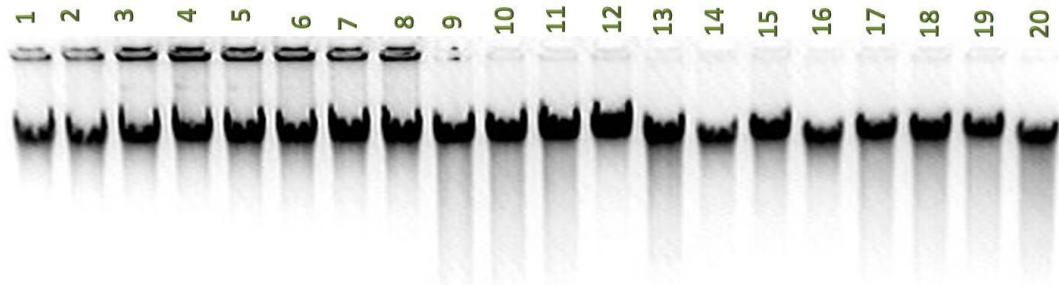


Figura 6. Evaluación de la integridad del ADN. En la imagen de la evaluación de la integridad del ADN genómico de los voluntarios, se puede observar que la mayoría de las muestras obtenidas presentan la misma concentración y no presentan degradación importante.

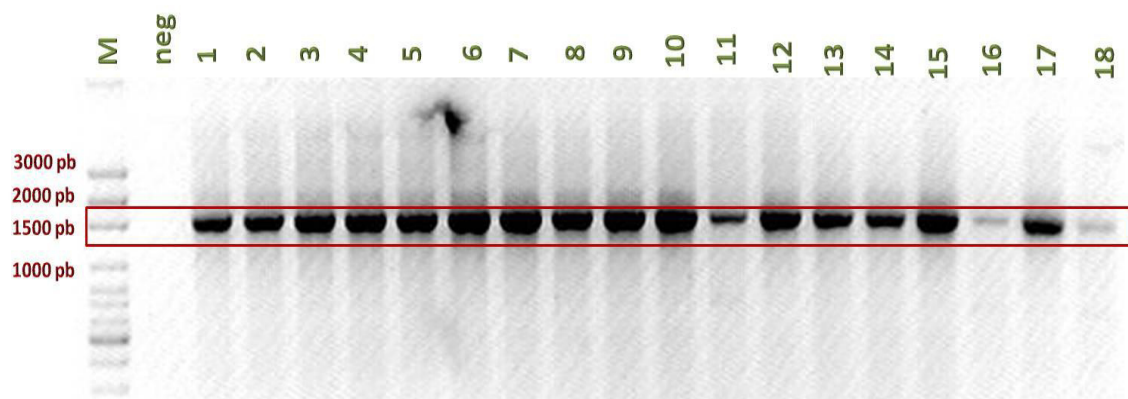


Figura 7. Amplificación de las muestras de ATV para el gen de referencia GH. En la figura se puede observar la amplificación de un fragmento de 1500 pb en todas las muestras evaluadas.

Las 60 muestras del protocolo de ATV cumplieron con los parámetros de calidad antes mencionados y por lo tanto fueron congeladas a -20°C hasta su análisis.

5.2 Validación del método de cuantificación

El método de cuantificación fue validado en Ipharma S. A. de C. V. En la especificidad se evaluaron diferentes sustancias de uso común, como las que se muestran en el cuadro 6, ninguno de las metabolitos analizados, así como muestras hemolizadas (PH) y muestras quillosas (PQ) presentan señal en el tiempo de retención de ATV y por lo tanto el método fue específico.

Cuadro 6. Especificidad del método de cuantificación.

Muestras	Interferencia
Ac. Acetilsalicílico	Negativa
Ac. Salicílico	Negativa
Cafeína	Negativa
Diclofenaco	Negativa
Ketoprofeno	Negativa
Ibuprofeno	Negativa
Ketorolaco	Negativa
Naproxeno	Negativa
Acetaminofen	Negativa
Teobromina	Negativa
PH	Negativa
PQ	Negativa

En la linealidad se evaluaron 5 curvas a 7 concentraciones diferentes donde el % de CV para el nivel más bajo debe ser < al 20 %, siendo para el resto de los niveles < al 15% y una correlación promedio > 0.99, por lo tanto nuestro método es lineal. Los resultados son mostrados en el cuadro 7.

Cuadro 7. Linealidad del método de cuantificación.

[Estándares]	0.5 ng/mL	2.5 ng/mL	5.0 ng/mL	10 ng/mL	25 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
% CV	2.800	1.512	3.201	2.764	1.131	1.260	0.625
Correlación promedio	0.99984						

El límite de cuantificación se establece con la concentración más baja de la curva de calibración y debe presentar un % de CV < al 20 % y la relación señal/ruido del límite de detección debe ser mayor a 2. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 8, donde podemos observar que el método de cuantificación es confiable hasta una concentración de 0.50 ng/mL. No obstante, el método permite detectar aún concentraciones más bajas (0.25ng/mL), este resultado nos permite establecer hasta donde es sensible nuestro método de cuantificación.

Cuadro 8. Límite de cuantificación y límite de detección.

Límite de cuantificación	Límite de detección
0.50 ng/mL	0.25 ng/mL
2.8 % CV	Señal/Ruido > 2

Para saber cuánto tiempo es estable la sustancia en la matriz biológica (plasma blanco), se evaluó la estabilidad a diferentes tiempos y a ciclos de congelación-descongelación.

La sustancia fue estable en la matriz biológica a 38 días, 11 horas en el auto-muestreador y después de 3 ciclos de congelación descongelación. Los resultados se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Estabilidad de la sustancia.

Tiempo	38 Días	11 Hrs	3 CC/D
Resultado	Estable	Estable	Estable

Los resultados de la precisión, exactitud, recobro, PH y PQ se resumen en el cuadro 10, los valores del % de CV deben ser menores al 15% y por lo tanto el método fue preciso en inter-análisis e intra-análisis. El % de error es menor al $\pm 15\%$ y por lo tanto el método es exacto. Lo hemolizado y lo quiloso no afectan la determinación de ATV en plasma ($< 15\%$ de CV). El porcentaje de recuperación se encuentra entre un 80 y 100% y por lo tanto se cumple con la norma.

Cuadro 10. Precisión, exactitud, recobro, determinación en PH y PQ.

	Precisión intra-análisis	Precisión inter-análisis	ATV en PH	ATV en PQ	Exactitud	% de recuperación
[Controles]	% CV	% CV	% CV	% CV	% de error	%
1.7 ng/mL	5.085	5.449	1.556	3.844	-1.426	87.204
7.5 ng/mL	3.293	5.316	1.036	1.416	-2.885	85.954
35 ng/mL	3.162	4.023	0.544	0.59	-3.284	88.000
75 ng/mL	1.747	2.513	0.166	1.63	-5.442	88.277

5.3 Análisis de los perfiles farmacocinéticos

Después del análisis de los perfiles farmacocinéticos, se obtuvieron los valores de los siguientes parámetros: AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, Cl/F , Vd/F , Ke y $T_{1/2}$, para cada uno de los 60 voluntarios participantes, los valores promedio para cada uno de los parámetros farmacocinéticos se resumen en el cuadro 11.

Cuadro 11. Datos farmacocinéticos promedio de ATV en los voluntarios.

DATOS FARMACOCINÉTICOS DE ATORVASTATINA								
	ABC_{0-t} (ng/mL*h)	$ABC_{0-\infty}$ (ng/mL*h)	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	Cl/F (L*h)	Vd/F (L)	Ke	$T_{1/2}$ (h)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)
Promedio	161.171	175.126	46.974	565.3223	8443.4336	0.078	11.161	1.529
DE	86.775	87.244	23.34	265.572	4931.734	0.034	6.579	0.955

Se puede observar como las desviaciones estándar de los parámetros farmacocinéticos ABC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, Cl/F , Vd/F , Ke , $T_{1/2}$ y T_{max} fueron muy grandes, de alrededor del 50% de los valores obtenidos, esto nos indica que existe una alta variabilidad interindividual en el metabolismo de ATV.

5.3.1 Fenotipos metabólicos

La clasificación metabólica permitió la identificación de tres diferentes fenotipos para el metabolismo de ATV, (figura 8).

El dendrograma es la representación gráfica del análisis de clusters (Figura 8), ha sido utilizado en otros estudios para agrupar similitudes de concentraciones plasmáticas.⁵⁶ En nuestro análisis observamos la formación de tres clusters diferentes: un cluster correspondiente a los metabolizadores rápidos (28.33%), otro a los metabolizadores normales (41.66%) y un tercero a los metabolizadores lentos (30%), con un valor promedio de $AUC_{0-t} = 84.10 \text{ ng/mL}\cdot\text{h}$, $159.32 \text{ ng/mL}\cdot\text{h}$ y $235.68 \text{ ng/mL}\cdot\text{h}$, respectivamente y una C_{\max} promedio de 24.10 ng/mL para el primer cluster, 40.97 ng/mL para el segundo cluster y 76.91 ng/mL para el tercer cluster (95% de intervalo de confianza). Los valores promedio obtenidos para los parámetros utilizados en la clasificación, son mayores en el grupo de metabolizadores lentos comparados con los alcanzados por los metabolizadores normales y metabolizadores rápidos. Las medias obtenidas por los metabolizadores normales fueron menores que las de los metabolizadores lentos y mayores que las de los metabolizadores rápidos, siendo estos últimos quienes mostraron valores más bajos para las medias del AUC_{0-t} y C_{\max} , resultados esperados ya que estos dos parámetros farmacocinéticos se utilizaron para establecer la clasificación fenotípica, el resumen de los resultados se muestra en el cuadro 12.

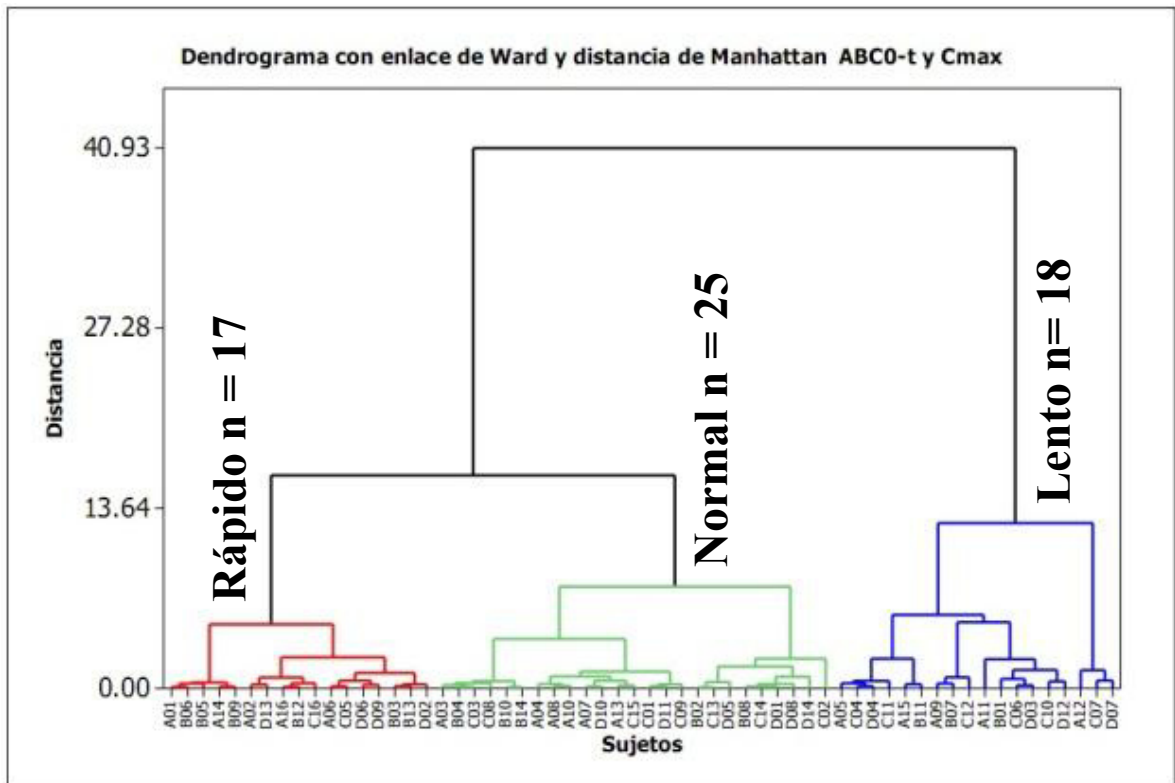


Figura 8. La clasificación de fenotipos en el grupo piloto. Se muestra el dendrograma con enlace de Ward y distancia de Manhattan. Se acoplan los grupos en base a las similitudes de concentraciones plasmáticas. El color rojo indica un metabolismo rápido, el verde un metabolismo normal y el azul un metabolismo lento.

Cuadro 12. Valores promedio de los parámetros farmacocinéticos por fenotipo.

Fenotipo	C_{\max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng/mL*h)
Lento	76.91 (69.64 - 84.18)	235.68 (188.61-282.76)
Normal	40.97 (38.47 - 43.47)	159.32 (140.18-178.46)
Rápido	24.1 (20.23-27.98)	84.1 (72.05-97.94)

Datos mostrados como medias (intervalo de confianza del 95%).

Para hacer más gráficas estas diferencias, en la figura 9 se muestran las diferentes curvas farmacocinéticas obtenidas para cada uno de los fenotipos. Se puede observar que los metabolizadores rápidos presentan una curva pequeña, siendo que los metabolizadores normales presentan un área mayor. Los metabolizadores lentos son los que presentan curva farmacocinética más grande. Comparando los valores obtenidos de los parámetros farmacocinéticos C_{\max} y AUC_{0-t} entre un metabolizador rápido y un metabolizador lento. Esta diferencia es de alrededor de 10 veces.

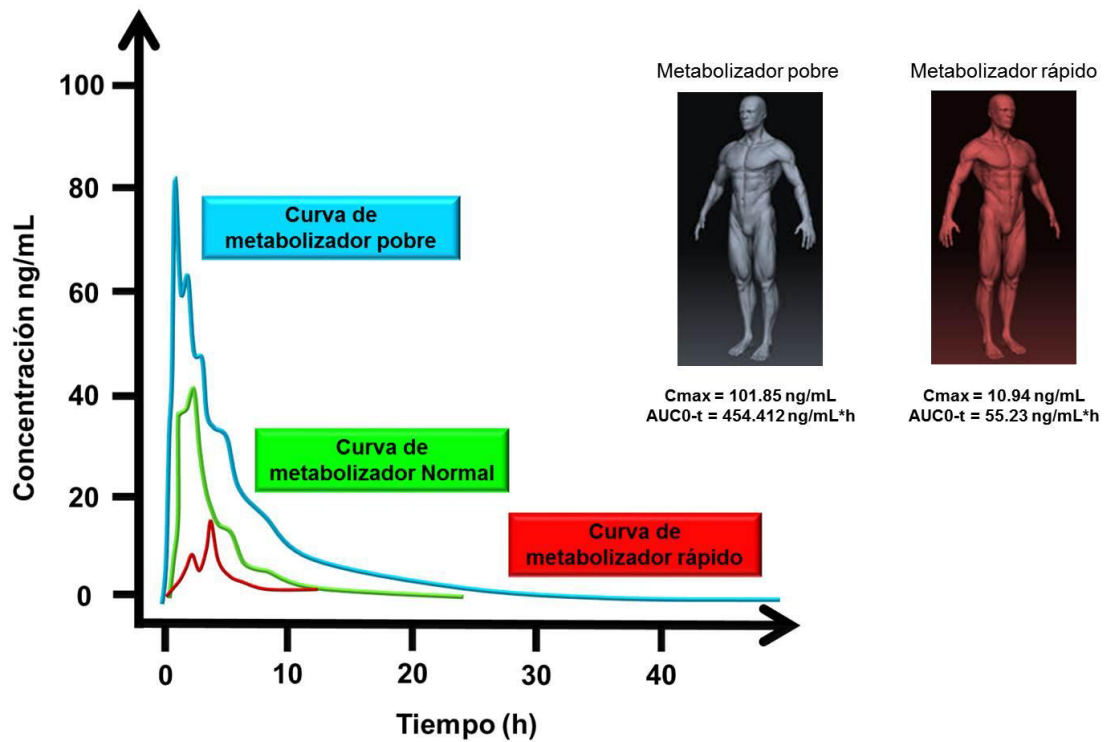


Figura 9. Diferencias de las curvas farmacocinéticas y los parámetros farmacocinéticos entre fenotipos metabolizadores. La curva más pequeña en color rojo corresponde a un metabolizador rápido, la curva intermedia en color verde corresponde a un metabolizador normal y la curva más grande en color azul corresponde a un metabolizador lento. El metabolizador lento (izquierda) metaboliza 10 veces menos la ATV, comparado con un metabolizador rápido (derecha).

5.4 Frecuencias alélicas y genotípicas

Cuadro 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los genes involucrados en el metabolismo de fármacos.

Número	Gen	Marcador	Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica			X ²	EHW
								EHW	valor de P
1	CYP1A1	Ile462Val	Ile = 0.67	Val = 0.33	Ile/Ile = 0.47	Ile/Val = 0.40	Val/Val = 0.13	0.6	0.439
2	CYP1A2	*1, *1F	*1 = 0.23	*1F = 0.77	*1/*1 = 0.08	*1/*1F = 0.30	*1F/*1F = 0.62	1.564	0.211
3	CYP2B6	G516T	G = 0.78	T = 0.22	G/G = 0.60	G/T = 0.37	T/T = 0.03	0.386	0.534
4	CYP2C19	*1, *2	*1 = 0.84	*2 = 0.16	*1/*1 = 0.693	*1/*2 = 0.29	*2/*2 = .017	0.284	0.594
5	CYP2C8	*1, *3	*1 = 0.91	*3 = 0.09	*1/*1 = 0.82	*1/*3 = 0.18	*3/*3 = 0.0	0.538	0.463
6	CYP2C9	*1, *3	*1 = 0.95	*3 = 0.05	*1/*1 = 0.9	*1/*3 = 0.1	*3/*3 = 0	0.169	0.681
7	CYP2D6	*1, *2, *4	*1 = 0.70	*2 = 0.22	*1/*1 = 0.48	*1/*2 = 0.37	*2/*2 = 0	3.403	0.333
				*4 = 0.08		*1/*4 = 0.074	*2/*4 = .074		
8	<i>CYP3A4</i>	<i>*1, *B</i>	<i>*1 = 0.94</i>	<i>*1B = 0.06</i>	<i>*1/*1 = 0.88</i>	<i>*1/*1B = 0.12</i>	<i>*1B/*1B = 0</i>	0.23	0.631
9	<i>CYP3A5</i>	<i>*1, *3</i>	<i>*1 = 0.19</i>	<i>*3 = .081</i>	<i>*1/*1 = 0.03</i>	<i>*1/*3 = 0.31</i>	<i>*3/*3 = 0.66</i>	0.005	0.941
10	GSTM1	P/A	P = 0.63	A = 0.37					
11	GSTM3	*A, *B	*A = 0.96	*B = 0.04	*A/*A = 0.92	*A/*B = 0.08	*B/*B = 0	0.113	0.736

12	GSTP1	Ile105Val	Ile = 0.48	Val = 0.52	Ile/Ile = 0.22	Ile/Val = 0.53	Val/Val = 0.25	0.276	0.599
13	GSTT1	P/A	P = 0.17	A = 0.83					
14	NAT ₂	*4, *5B, *5A, *5C, *5D *6A, *7B,	*4 = 0.29	*5A = 0.05	*4/*4 = 0.08	*4/*5B = 0.23	*5A/*5C = 0.1		¥
				*5B = 0.29		*4/*5D = 0.06	‡	¥	
				*5C = 0.08		*5B/*5B = 0.08	‡	¥	
				*6A = 0.07		*5B/*7B = 0.08	‡	¥	
				*7B = 0.06		*6B/*6A = 0.08	‡	¥	
15	TPMT	*1, *3	*1 = 0.99	*3 = 0.01	*1/*1 = 0.98	*1/*3 = 0.02	*3/*3 = 0	0.005	0.94
16	MDR1	C3435T	C = 0.48	T = 0.52	C/C = 0.22	C/T = 0.53	T/T = 0.25	0.276	0.599
17	ADRB1	Arg389Gly	Arg = 0.82	Gly = 0.18	Arg/Arg = 0.70	Arg/Gly = 0.25	Gly/Gly = 0.05	1.08	0.298
18	ADRB2	Arg16Gly	Arg = 0.31	Gly = 0.69	Arg/Arg = 0.12	Arg/Gly = 0.38	Gly/Gly = 0.5	0.615	0.432
19	AGTR1	A1166C	A = 0.72	C = 0.28	A/A = 0.54	A/C = 0.35	C/C = 0.11	0.979	0.322
20	BDKRB2	C58T	C = 0.62	T = 0.38	C/C = 0.38	C/T = 0.48	T/T = 0.14	0.036	0.847
21	DRD3	Ser9Gly	Gly = 0.50	Ser = 0.50	Gly/Gly = 0.28	Gly/Ser = 0.44	Ser/Ser = 0.28	1.066	0.301
22	GRIN2B	C2664T	C = 0.65	T = 0.35	C/C = 0.44	C/T = 0.42	T/T = 0.14	0.253	0.614
23	HTR2A	His452Tyr	His = 0.89	Tyr = 0.11	His/His = 0.78	His/Tyr = 0.22	Tyr/Tyr = 0	0.886	0.347
		C102T	C = 0.61	T = 0.39	C/C = 0.38	C/T = 0.45	T/T = 0.17	0.186	0.666
24	ADD1	Gly460Trp	Gly = 0.83	Trp = 0.17	Gly/Gly = 0.67	Gly/Trp = 0.28	Trp/Trp = 0.05	0.439	0.507
25	AGT	Met235Thr	Met = 0.30	Thr = 0.70	Met/Met = 0.06	Met/Thr = 0.47	Thr/Thr = 0.47	0.74	0.389

26	BCHE	Asp70Gly	Asp = 0.99	Gly = 0.01	Asp/Asp = 0.98	Asp/Gly = 0.02	Gly/Gly = 0	0.004	0.948
		Ala539Thr	Ala = 0.875	Thr = 0.125	Ala/Ala = 0.75	Ala/Thr = 0.25	Thr/Thr = 0	1.224	0.268
27	COMT	Val108Met	Val = 0.61	Met = 0.39	Val/Val = 0.37	Val/Met = 0.48	Met/Met = 0.15	0.012	0.911
28	DPYD	IVS14+1G>A	G = 1.0	A = 0.0	G/G = 1.0	G/A = 0.0	A/A = 0.0	4 E ⁻⁵	0.994
29	ERCC2	Lys751Gln	Lys = 0.75	Gln = 0.25	Lys/Lys = 0.57	Lys/Gln = 0.37	Gln/Gln = 0.06	0.029	0.863
30	IL10	G1082A	G = 0.31	A = 0.69	G/G = 0.15	G/A = 0.32	A/A = 0.53	3.98	0.046
31	MTHFR	C677T	C = 0.54	T = 0.46	C/C = 0.23	C/T = 0.62	T/T = 0.15	3.512	0.06
32	TNF	G308A	G = 0.92	A = 0.08	G/G = 0.84	G/A = 0.16	A/A = 0.0	0.402	0.525
33	TYMS	Del/Ins 3'- UTR 6pb	Del = 0.40	Ins = 0.60	Del/Del = 0.13	Del/Ins = 0.53	Ins/Ins = 0.34	0.74	0.389
34	VKORC1	G1639A	G = 0.53	A = 0.47	G/G = 0.28	G/A = 0.50	A/A = 0.22	0.001	0.972
35	ABCG2	Rs2231142	G = 0.83	T = 0.17	G/G = 0.68	G/T = 0.30	T/T = 0.02	0.384	0.535
36	SLCO1B1	Rs4149056	C = 0.10	T = 0.90	C/C = 0.02	C/T = 0.16	T/T = 0.82	0.329	0.566

P = marcador presente, A = marcador ausente, ‡ = genotipos con frecuencia < 0.01, ¥ = no calculado.

Se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas de marcadores en genes con posible impacto en el metabolismo de ATV, correspondientes a los 60 voluntarios que participaron en este estudio piloto. De los 33 genes a los cuales se les calculó el equilibrio de HW, todos se encontraron en equilibrio ($p \leq 0.05$) (cuadro 13).

5.5 Análisis estadístico para determinar posibles asociaciones entre fenotipos y genotipos

De todos los genes analizados, sólo el gen *MDR1* mostró asociación entre los fenotipos y los genotipos ($p = 0.040$). Los resultados del análisis de asociación para los genes más importantes en el metabolismo de ATV se muestran en los cuadros 14, 15 y 16.

Cuadro 14. Análisis de asociación del gen *CYP3A4*.

<i>CYP3A4</i>	Fenotipo Metabolizador		
	Lento	Normal	Rápido
*1/*1	16	22	53
*1/*1B	2	3	7
*1B/*1B	0	0	0

$p = 1.0$

Cuadro 15. Análisis de asociación del gen *CYP3A5*.

<i>CYP3A5</i>	Fenotipo Metabolizador		
	Lento	Normal	Rápido
*1/*1	0	1	1
*1/*3	3	8	7
*3/*3	13	16	9

p = 0.250

Cuadro 16. Análisis de asociación del gen *MDR1*.

<i>MDR1</i> C3435T	Fenotipo Metabolizador		
	Lento	Normal	Rápido
C/C	0	7	6
C/T	13	13	6
T/T	5	5	5

p = 0.040

Dado que sólo en el gen *MDR1* se encontró asociación entre fenotipos y genotipos, se calculó la asociación de los valores promedio de los parámetros

farmacocinéticos [C_{\max} (ng/mL), AUC_{0-t} (ng/mL*h), $AUC_{0-\infty}$ (ng/mL*h) y Cl/F (L*h)] con cada genotipo. Los resultados se resumen en el cuadro 17.

Cuadro 17. Asociación entre los valores farmacocinéticos promedio y genotipos del polimorfismo C3435T del gen *MDR1*.

Genotipo	n	C_{\max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng/mL*h)	$AUC_{0-\infty}$ (ng/mL*h)	Cl/F (L*h)
C/C	13	33.76 (27.89 - 39.63)	129.03 (98.65 - 159.41)	144.08 (111.52 - 176.64)	652.70 (506.53 - 798.80)
C/T	32	46.6 (38.97 - 54.22)	161.41 (131.50 - 191.32)	175.62 (145.55 - 205.69)	557.40 (470.58 - 644.22)
T/T	15	50.4 (39.33 - 61.57)	172.57 (130.10 - 215.04)	186.19 (143.23 - 229.15)	506.63 (406.54 - 606.72)
Valor de P		0.099	0.429	0.48	0.48

Los valores promedio de C_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ y Cl/F fueron calculados para cada uno de los tres genotipos (cuadro 17). Se observó un aumento de las cantidades obtenidas en relación con la presencia del alelo T. Sin embargo, en la prueba de Kruskal Wallis, con respecto a los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, (valores de $p = 0.099$, 0.429 , 0.48 , y 0.48 , respectivamente).

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

Los hallazgos encontrados en este estudio piloto donde el metabolismo de sujetos sanos fue clasificado, describe tres tipos de metabolismo para ATV correspondientes a los fenotipos metabolizadores: lento, normal y rápido (figura 8). Este resultado es más claro cuando se comparan las medias de los valores obtenidos de C_{\max} y AUC_{0-t} de cada fenotipo (cuadro 12). Es evidente que en el grupo de metabolizadores lentos, el fármaco tarda más tiempo en ser eliminado del organismo y los valores de C_{\max} y AUC_{0-t} son mayores que los de los metabolizadores normales y rápidos. El número y tipo de fenotipos que nosotros obtuvimos en nuestra población, concuerdan con los reportados por Gonzalez *et al.*,⁵⁷ en individuos del oeste de México. No obstante, la evaluación del comportamiento de un fármaco recae en dos áreas principalmente: la farmacocinética y la farmacodinamia. La primera, se enfoca principalmente en evaluar el proceso ADME

de un medicamento y por lo tanto, la variación en genes responsables de este proceso pueden explicar los diferentes fenotipos.⁸ Por esta razón, fue importante determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de 87 polimorfismos en 36 genes relacionados con el metabolismo de fármacos.

Una vez obtenidas las frecuencias alélicas y genotípicas el equilibrio de HW fue calculado para 33 genes. Todos los marcadores analizados se encontraron en EHW ($p \leq 0.05$) (cuadro 13). El motivo de la exclusión de los genes *GSTM1* y *GSTT1* de este análisis, fue debido a que sólo fue detectada la presencia o ausencia de los polimorfismos evaluados en estos genes en la muestra. Para el caso de *NAT₂*, este gen es muy polimórfico en nuestra población y por lo tanto el número de sujetos por variante no permitió realizar el cálculo (cuadro 13).

Debido a que la ATV es metabolizada principalmente por el producto del gen *CYP3A4*,^{58,59} la variación genética en éste puede explicar los tipos de metabolismo observados para ATV en este estudio. Encontramos que la frecuencia del alelo *1B del gen *CYP3A4* es baja (0.06) en la población de estudio y está dada únicamente por los genotipos heterocigotos (*1/*1B), siendo que el genotipo (*1B/*1B) estuvo ausente (cuadro 14). Las frecuencias alélicas encontradas para el marcador *CYP3A4**1B concuerdan con las reportadas en población mexicana (0.08),⁶⁰ en población chilena, (0.11),⁵² en población brasileña (0.13)⁶¹ y en población europea (0.04), pero difieren de las reportadas en población africana (0.82) y afroamericana (0.67).⁶²

Así mismo, el gen *CYP3A5* ha sido relacionado con la respuesta al tratamiento con estatinas,⁶³ por lo tanto buscamos si la variación en este gen influye en la

variabilidad farmacocinética encontrada. Nuestros resultados revelan que las frecuencias para el alelo silvestre de *1 del gen *CYP3A5* es baja (0.19), siendo el alelo variante *3 el más abundante (0.81). En este caso se observaron los tres genotipos dados por la combinación de estos marcadores, siendo el más frecuente el genotipo variante *3/*3 (0.66), seguido del heterocigoto *1/*3 (0.31) y *1/*1 (0.03) (cuadro 15). Además de estos marcadores, se encontraron la presencia del alelo *6 del gen *CYP3A5* en dos sujetos de manera heterocigota con el alelo *3. Las frecuencias aquí presentadas son similares a las reportadas en población chilena para el alelo *3 (0.73),⁵² en población europea (0.94)⁶² y en población caucásica (0.93);⁶⁴ no obstante, las frecuencias son muy diferentes a las reportadas en población africana (0.12).⁶²

Finalmente, evaluamos si el marcador C3435T en el gen *MDR1* podía explicar los distintos fenotipos observados. Los resultados muestran que el alelo variante T es más común en los sujetos estudiados (0.52). Estos resultados se explican porque el genotipo más frecuente fue el heterocigoto C/T (0.53), seguido del homocigoto variante T/T (0.25) y por último el homocigoto para el alelo silvestre C/C (0.22) (cuadro 16). Nuestros hallazgos son similares a los reportados para el alelo variante T en población Lahu (0.54),⁶⁵ en población holandesa (0.52)⁶⁶ y en población caucásica (0.53),⁶⁴ pero diferentes a las encontradas en población chilena (0.34),⁵² en población africana (0.17) y afroamericana (0.39).⁶⁷

CAPÍTULO 7

CONCLUSIÓN

En el presente estudio preliminar de farmacogenética de fármacos de alta variabilidad, se examinaron el efecto de la variación génica en el metabolismo de ATV en un grupo piloto de voluntarios sanos mexicanos. Se encontró evidencia estadísticamente significativa ($p = 0.04$), de la asociación entre los genotipos del marcador C3435T del gen *MDR1* y los fenotipos metabolizadores encontrados para ATV (cuadro 16). A su vez, resultó evidente que los marcadores en los genes *CYP3A4* y *CYP3A5*, no explican los fenotipos encontrados en este estudio piloto. La ausencia del genotipo homocigoto variante para el marcador *CYP3A4**1B no explica los tres fenotipos observados. Las aparentes discrepancias entre los fenotipos y los genotipos encontrados para los marcadores *CYP3A5* *1, *3 y *6, se explican por la baja frecuencia del genotipo (*1/*1) y del alelo *6.

En este estudio para el metabolismo de ATV, sólo pudimos asociar los fenotipos encontrados con por la variación génica en el gen *MDR1* (C3435T) y no por algún otro gen. Al comparar los valores obtenidos para C_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ y Cl/F , estos son mayores en el grupo de homocigotos C/T y heterocigotos T/T para el alelo T. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas (cuadro 17). A pesar de no encontrar significancia estadística entre los valores de los parámetros farmacocinéticos analizados y los genotipos del gen *MDR1*, estos muestran una tendencia hacia la asociación ($p = 0.09$).

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en el cual se utilizan herramientas de genotipificación masiva (microarreglos), para predecir el metabolismo de medicamentos comúnmente usados por la población mexicana, como es el caso de la ATV. Concluimos que es deseable aumentar el número de muestras por genotipo, para incrementar el poder estadístico y así determinar si las diferencias entre los valores farmacocinéticos son verdaderamente significativos. Debido a esto, nuestros resultados pueden ser considerados para meta-análisis futuros.

La contribución de este trabajo fue generar información acerca de los tipos de metabolismo de ATV y proporcionar las frecuencias alélicas y genotípicas de marcadores en genes del metabolismo y respuesta a fármacos en nuestra población, así como establecer la influencia de estos en el metabolismo de ATV.

Este tipo de estudios son de utilidad para disminuir el número de voluntarios en los protocolos para fármacos de alta variabilidad farmacocinética y de estrecho margen terapéutico, al realizar un tamizaje previo a la selección de voluntarios.

Secuenciar los genes que intervienen en el metabolismo sería lo más recomendable para descubrir cuáles son las variantes génicas de las enzimas metabolizadoras, así como de los transportadores que están asociados con el metabolismo de medicamentos en la población analizada.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Como tareas en curso se ha logrado avanzar en la clasificación de los fenotipos metabólicos para los otros 12 estudios de bioequivalencia. Se muestran los resultados en las figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17.

El metabolismo fue clasificado usando los parámetros farmacocinéticos C_{\max} y AUC_{0-t} y podemos observar la formación de varios clusters principalmente 3, correspondientes a metabolizadores lentos, normales y rápidos.

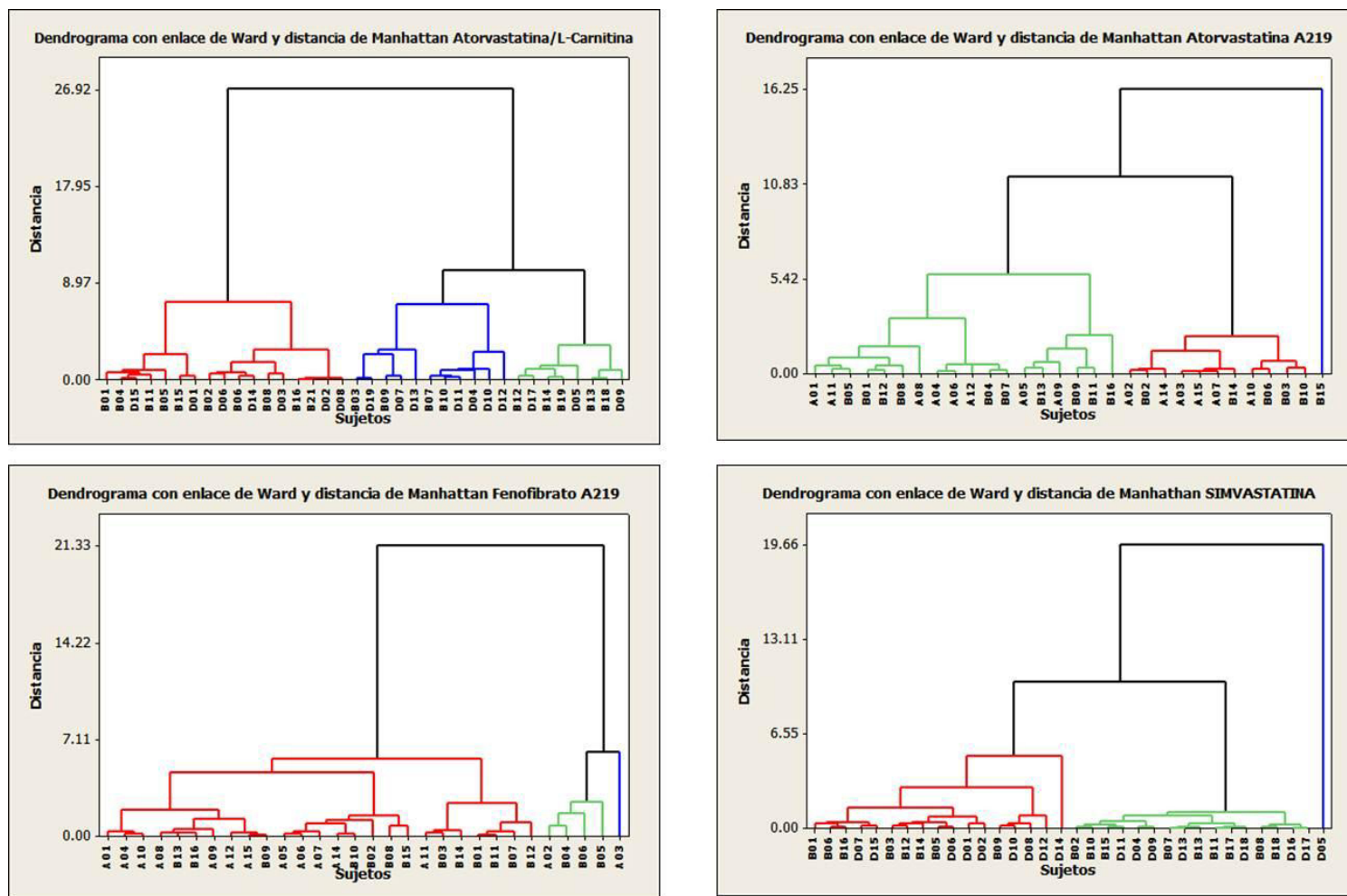


Figura 10. Clasificación metabólica de las estatinas.

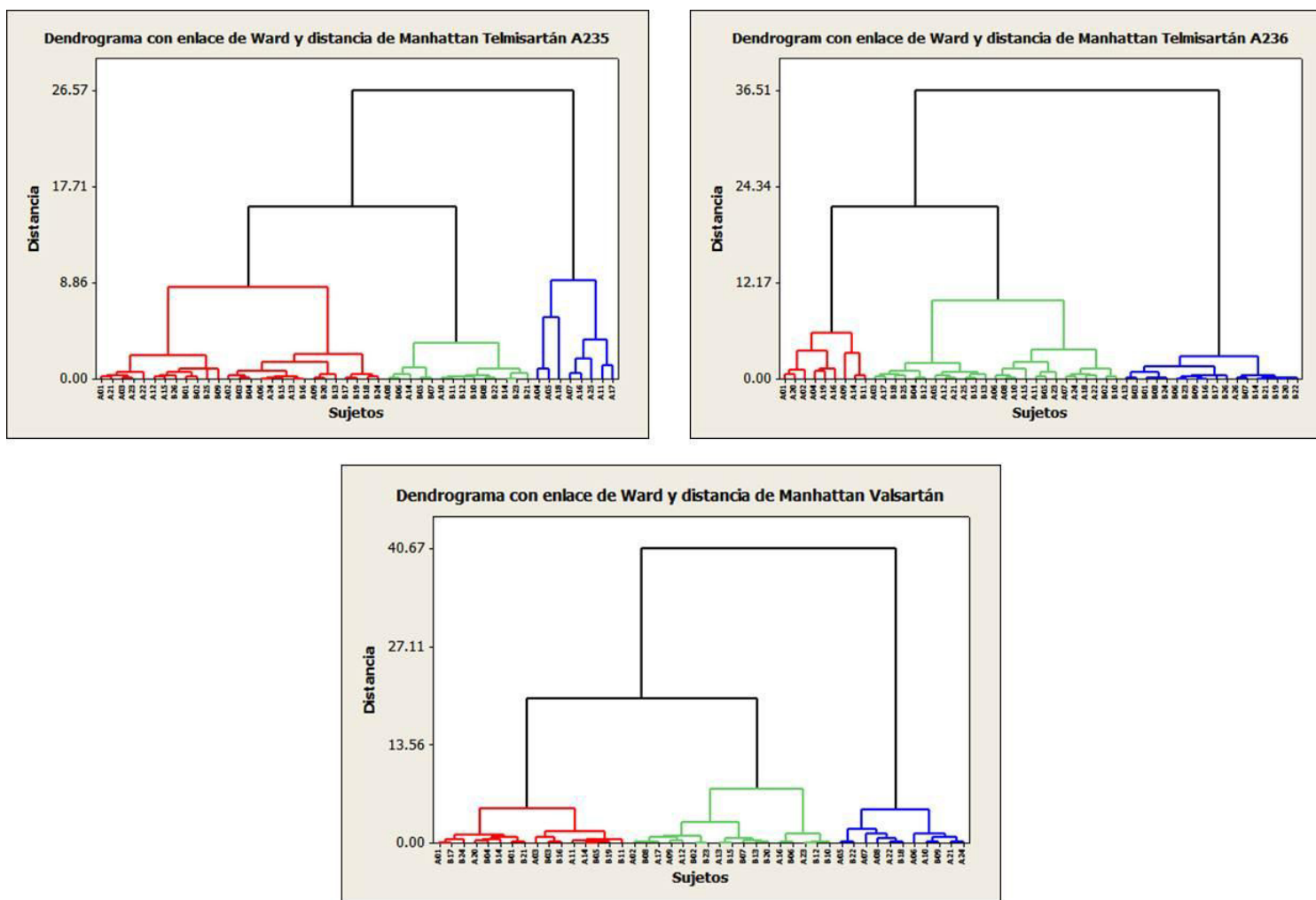


Figura 11. Clasificación metabólica de los antihipertensivos.

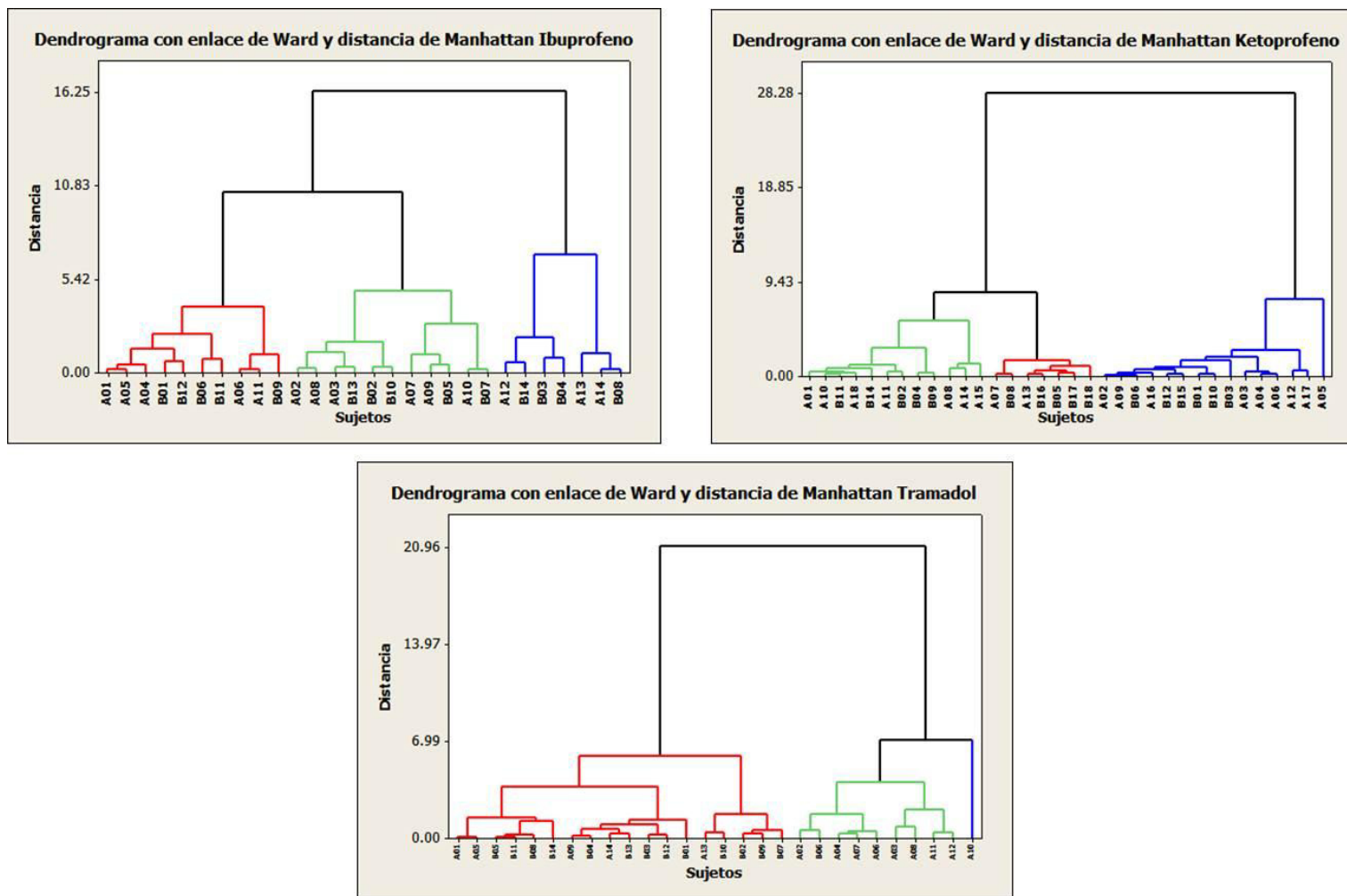


Figura 12. Clasificación metabólica de los analgésicos.

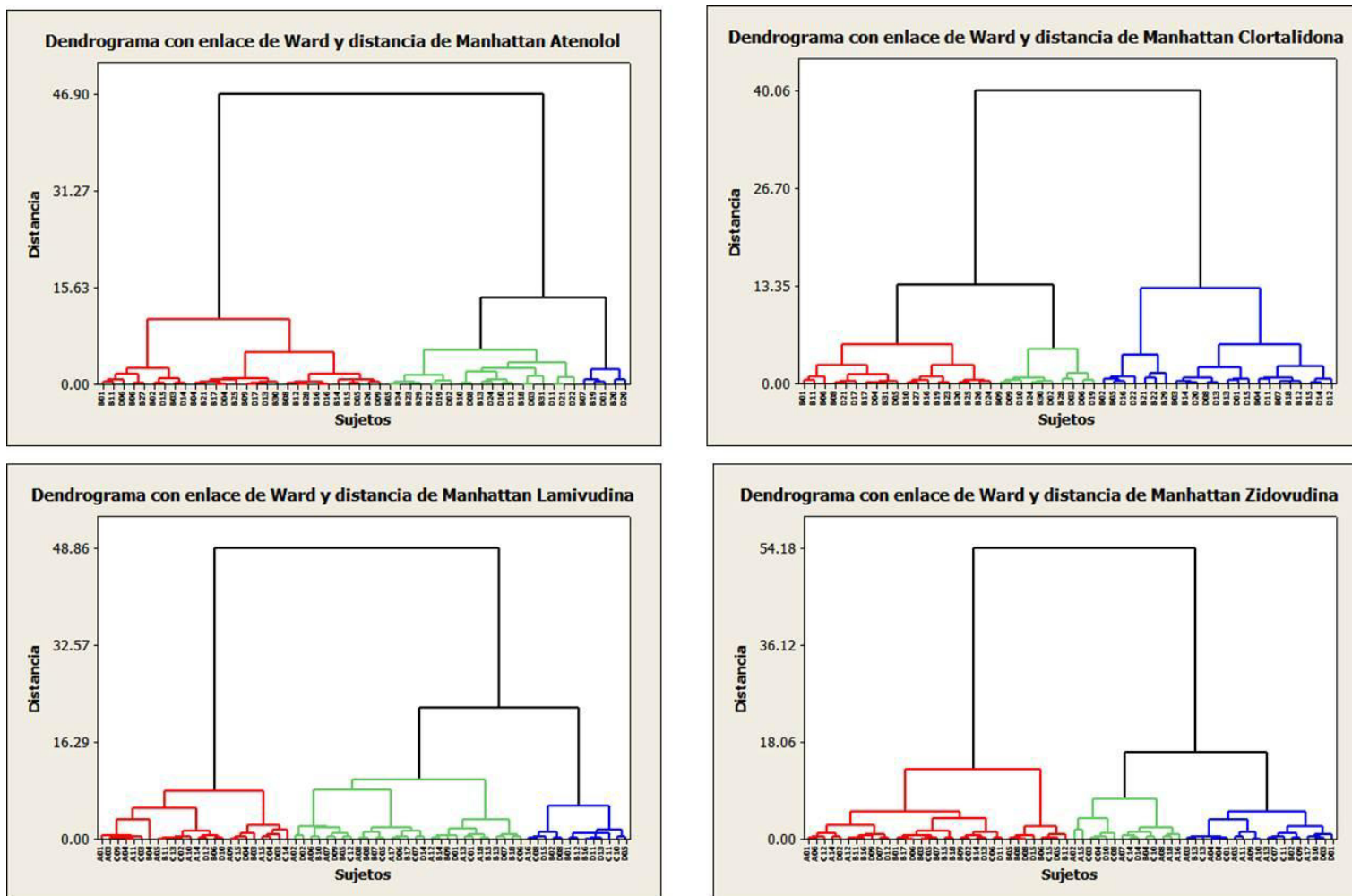


Figura 13. Clasificación metabólica de otros fármacos.

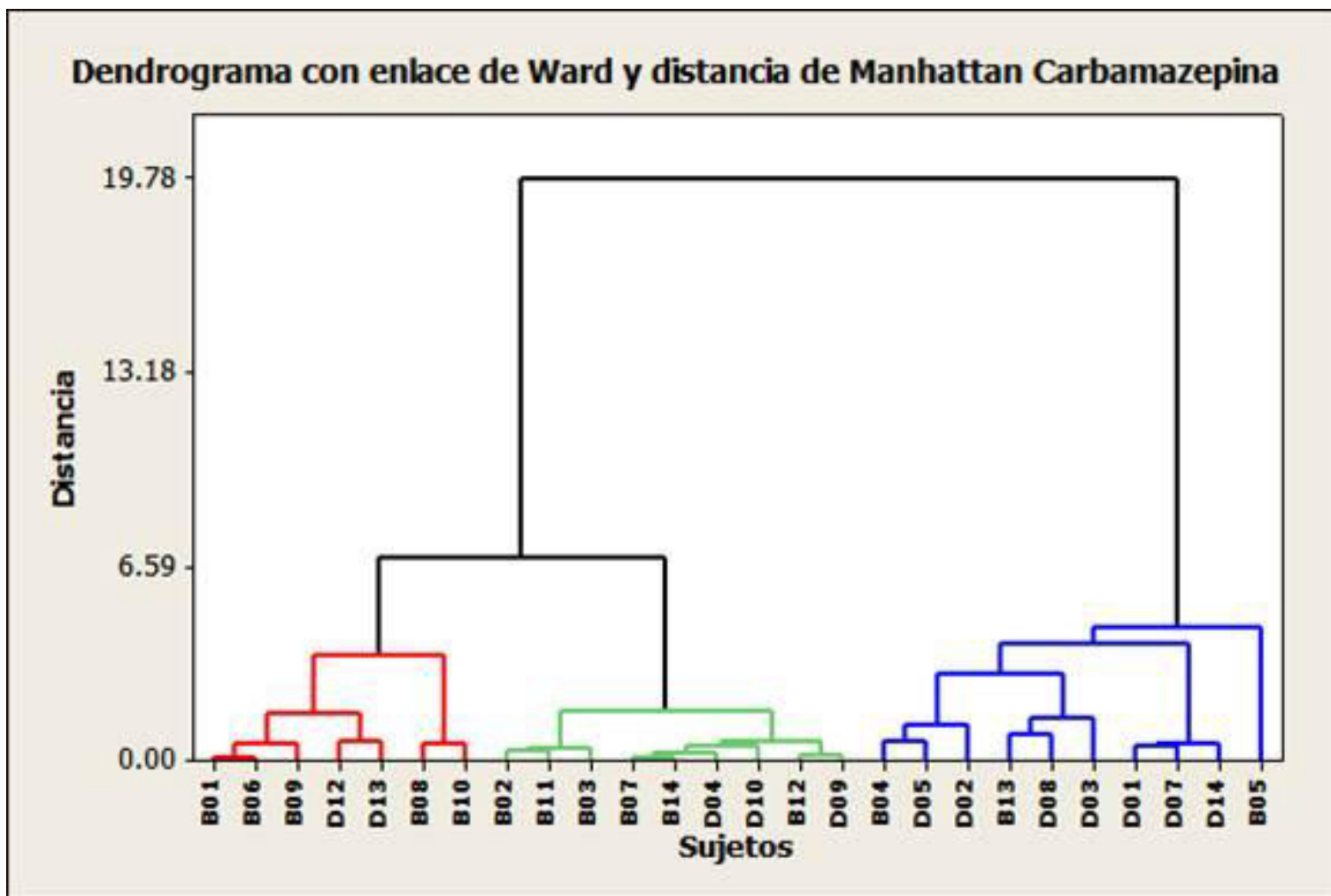


Figura 14. Clasificación metabólica de las Carbamazepina.

Debido a que el producto del gen *CYP3A4* es el principal responsable del metabolismo de ATV, también se diseñaron 14 pares de oligos específicos para amplificar las regiones exónicas de *CYP3A4*. Ejemplos de los resultados se muestran en la figura 15.

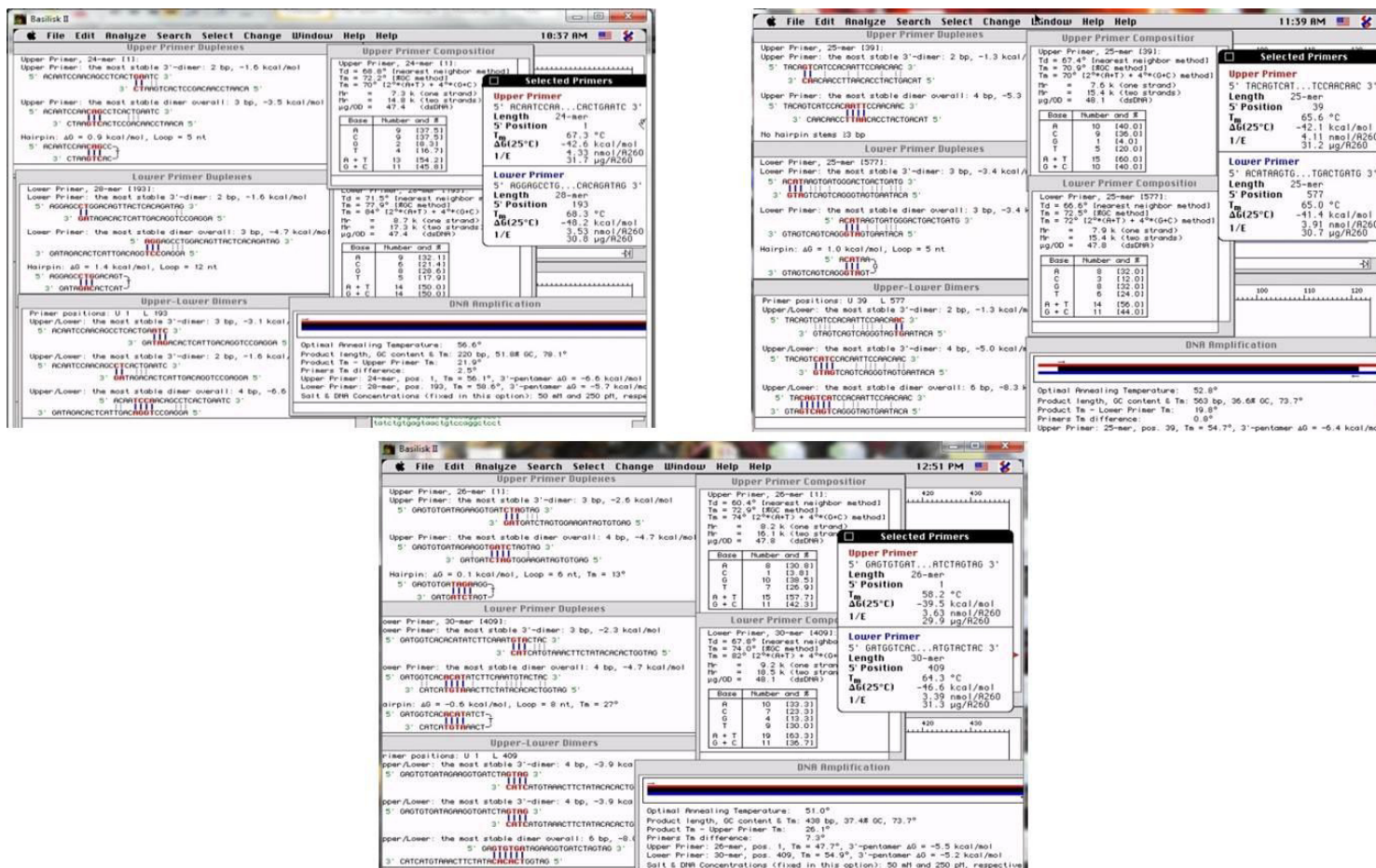


Figura 15. Ejemplo del diseño de oligos para el exón 1, 9 y 12.

También se estandarizaron las 14 reacciones de PCR para amplificar cada una de las regiones exónicas del gen *CYP3A4*. El resumen de los resultados se muestra en la figura 16.

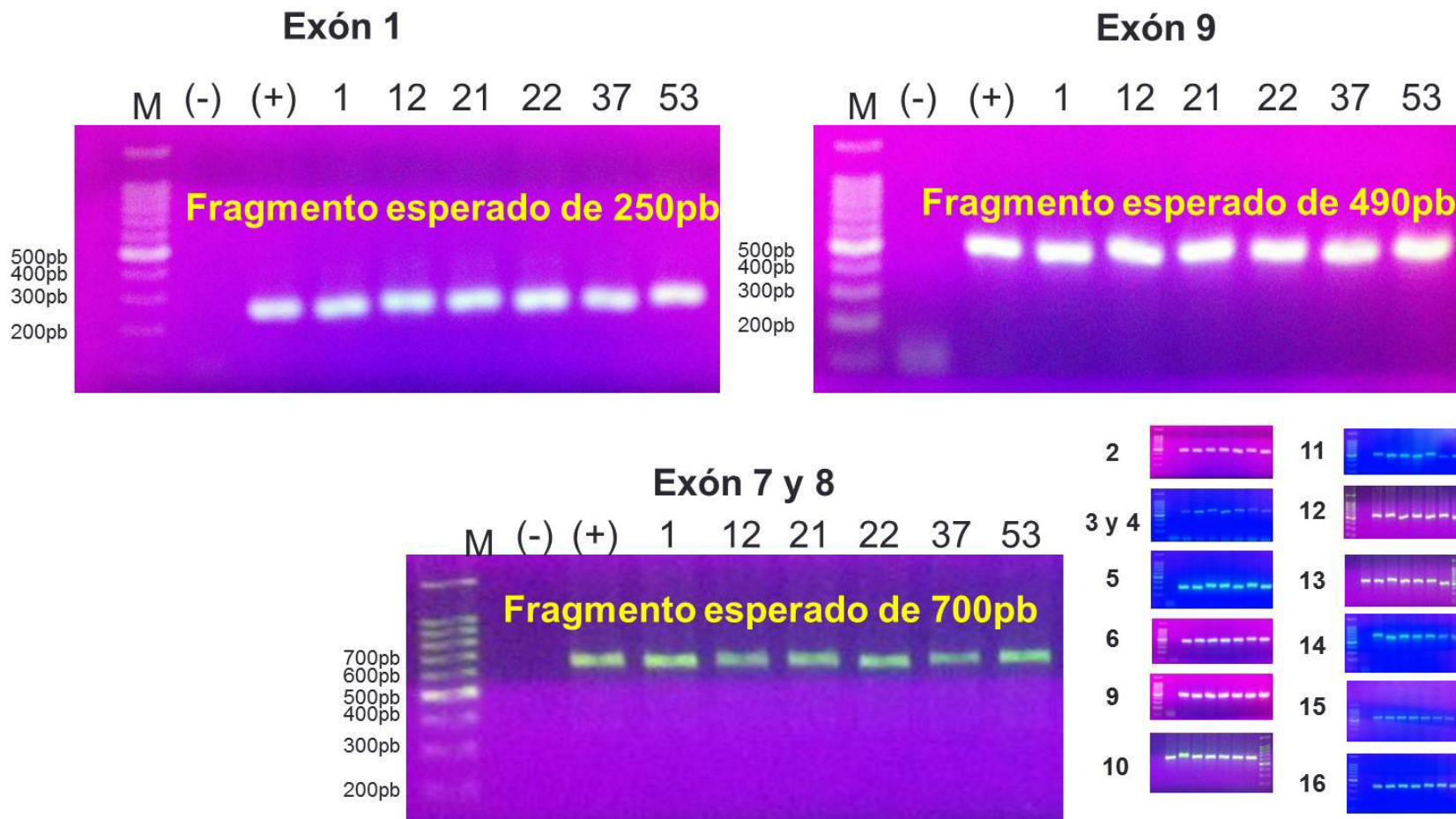


Figura 16. Estandarización de las 14 PCRs.

Ya fueron seleccionados 6 sujetos y fue secuenciado el exón 9 de dicho gen, sin encontrar ningún cambio dentro de la secuencia lograda a la fecha. Los resultados se muestran en la figura 16.

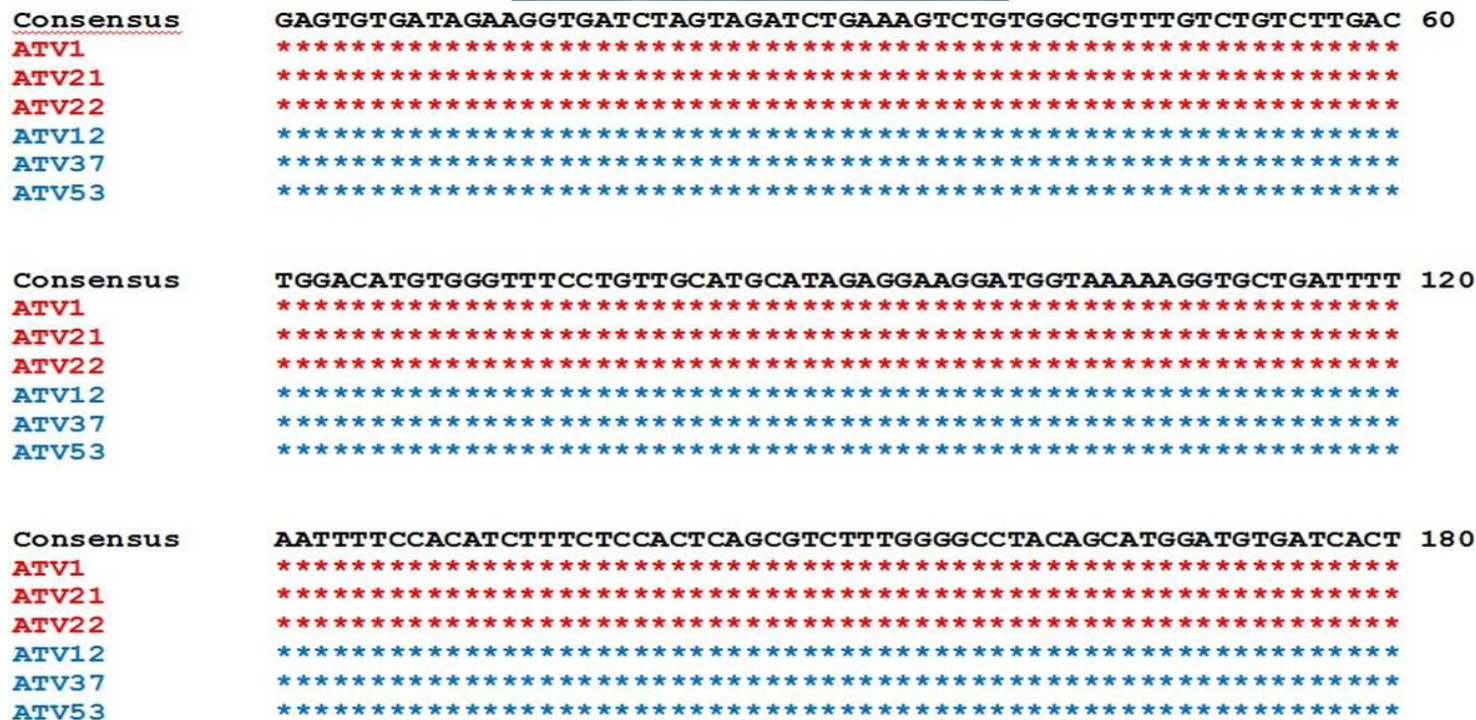
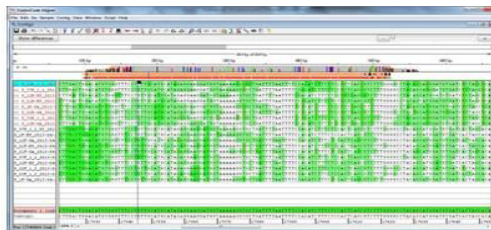


Figura 17. Alineamiento de las secuencias del exón 9.

Está también en curso el secuenciar 11 genes que intervienen en el metabolismo de ATV en los sesenta voluntarios, por medio de secuenciación masiva de nueva generación, siendo los genes candidatos: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2D6*, *MDR1*, *ABCG2*, *SLCO1B1*, *UGTs* y *GSTs*.

Se espera que todos estos experimentos en curso se concluyan en debido tiempo y se integren en publicaciones próximas a derivarse también de esta tesis.

ANEXO 1

EJEMPLO DE REPORTE DE VALIDACIÓN

1.- ESPECIFICIDAD:

Condiciones experimentales:

1.- Se analizó la matriz biológica (plasma sin Atorvastatina) de 8 voluntarios diferentes, y un plasma hemolizado y un quísono.

2.- Se analizaron otras sustancias para establecer si hay interferencia con Atorvastatina.

RESULTADOS:

Al analizar los cromatogramas obtenidos se puede concluir que el método es específico para la determinación de Atorvastatina.

1) Las muestras analizadas no presentan señal en el tiempo de retención de Atorvastatina.

Blanco	Señal Atorvastatina
Blanco 1	No señal
Blanco 2	No señal
Blanco 3	No señal
Blanco 4	No señal
Blanco 5	No señal
Blanco 6	No señal
Blanco 7	No señal
Blanco 8	No señal
Blanco hemolizado	No señal
Blanco quísono	No señal

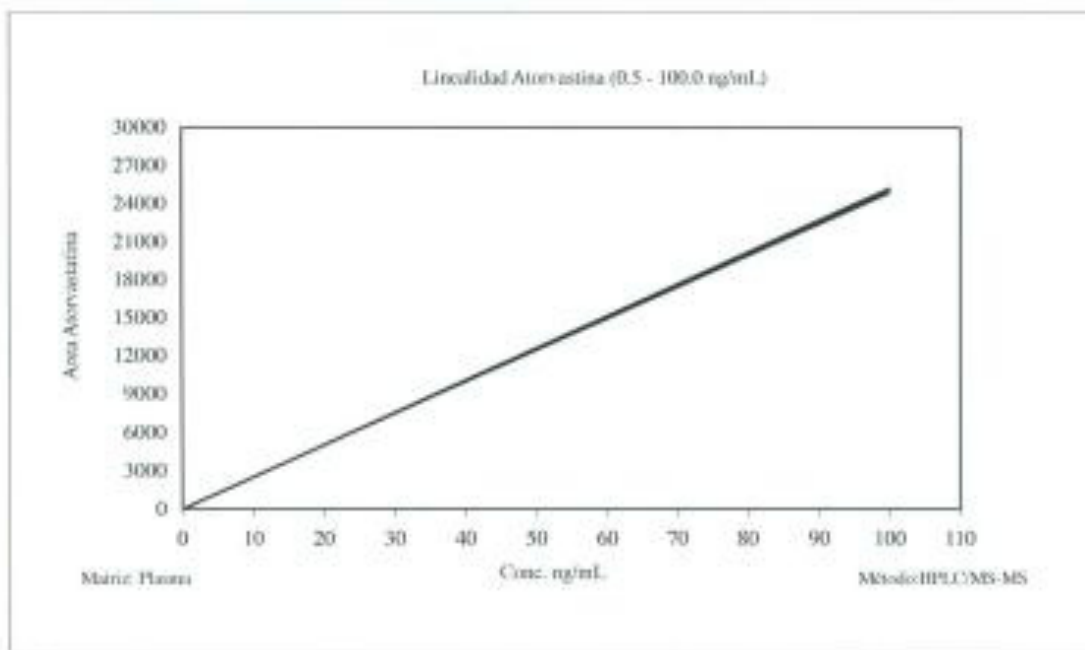
2) Las sustancias analizadas no interfieren con Atorvastatina.

16/10/2009	Atorvastatina
Ac. Acetil Salicílico	No señal
Ac. Salicílico	No señal
Cafeína	No señal
Diclofenaco	No señal
Ibuprofeno	No señal
Ketorolaco	No señal
Naproxeno	No señal
Ketoprofeno	No señal
Teobromina	No señal
Acetaminófen	No señal

MS-MS-ES (+) MRM Ión Precursor de Atorvastatina: 539.5 m/z, Ión Producto: 440.3

Criterio de Aceptación: las muestras analizadas no deben dar señal en el tiempo de retención de Atorvastatina.

Conclusión: Por lo anterior mencionado se concluye que el método utilizado en la determinación de Atorvastatina es específico.



2- Linealidad (Intervalo de Trabajo)

Condiciones experimentales: Estándares de calibración de Atorvastatina en matriz biológica sometidas a todo el proceso analítico, Rango: 0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 ng/mL.

8/10/09									FC
Nivel	ng/mL	AAtorvastatina	AAtorvastatina	AAtorvastatina	AAtorvastatina	AAtorvastatina	AAProm	%CV	Conc./AAProm
1	0.5	137.994	132.921	137.740	143.829	138.501	138.197	2.800	0.0036
2	2.5	630.868	616.939	604.995	621.763	620.216	618.956	1.512	0.0040
3	5.0	1283.290	1369.540	1318.550	1282.790	1264.270	1303.688	3.201	0.0038
4	10.0	2554.170	2590.440	2516.880	2432.410	2441.030	2506.986	2.764	0.0040
5	25.0	6355.350	6222.770	6180.080	6261.250	6191.740	6242.238	1.131	0.0040
6	50.0	12760.400	12529.400	12392.400	12573.900	12369.300	12525.080	1.260	0.0040
7	100.0	25229.500	25230.700	24884.700	25074.200	25254.900	25134.800	0.625	0.0040
							Promedio	1.899	0.0039
								%CVFCP	4.101

		Promedio	%CV
Correlación		0.99997	0.99973
b		10.604	12.447
Pendiente		253.251	251.843
		248.390	250.240
		249.889	250.723
			0.747

Linealidad: obtenida con el %CV del Factor de Calibración promedio para cada nivel (%CVFCP).

Precisión: Obtenida del promedio de los %CV de cada concentración (%CVP).

Precisión de las pendientes

Correlación de la curva promedio

AAtorvastatina: Área de Atorvastatina

AAProm: Área de Atorvastatina Promedio

Criterios de Aceptación: Se acepta en precisión un %CV igual o menor al 20% para el nivel más bajo y de un igual o menor al 15% para los otros niveles.

Se acepta una correlación Mayor o igual al 0.99.

Conclusión: Los criterios de aceptación antes mencionados son aprobados por lo que se concluye que hay linealidad en este rango de trabajo.

%CV	4.101
%CVP	1.899
%CV	0.747
	0.99987

2.- Linealidad (Intervalo de Trabajo)

Condiciones experimentales: Estándares de calibración de Atorvastatina en matriz biológica sometidas a todo el proceso analítico. Rango: 0.5, 2.5, 5.0, 10, 25, 50, 100 ng/mL.

8/10/09	Nivel	ng/mL	AAtorvastatina	AAtorvastatina	AAtorvastatina	AAtorvastatina	AAtorvastatina	CAProm	%CV	% Error
	1	5.0	5.030	5.088	4.940	5.138	5.928	5.2	7.656	-4.4936
	3	25	22.479	29.557	25.246	26.084	23.615	25.4	10.691	1.5845
	4	50	49.109	46.436	50.146	48.364	49.895	48.8	3.054	-2.4200
	5	100	103.899	99.891	101.567	101.874	101.232	101.7	1.423	1.6926
	6	250	253.780	246.415	240.209	242.865	250.646	246.8	2.243	-1.2868
	7	500	509.021	503.496	499.066	498.321	496.863	501.4	0.987	0.2707
								Promedio	4.342	0.7224
								DE		2.450

Criterios de Aceptación: Se acepta en precisión un %CV igual o menor al 20% para el nivel más bajo y de un igual o menor al 15% para los otros niveles. Se acepta un error igual a +/- 20% para el nivel mas bajo y un +/- 15% para el resto de los niveles.

AAtorvastatina: Concentracion Atorvastatina

CAProm: Concentracion Atorvastatina Promedio.

Conclusión: Los criterios de aceptación antes mencionados son aprobados por lo que se concluye que hay linealidad en este rango de trabajo.

3.- Límite de Cuantificación (LC) y Límite de Detección (LD)

ng/mL	Atorvastatina	Atorvastatina	Atorvastatina	Atorvastatina	Atorvastatina	Promedio	%CV
0.5	137.994	132.921	137.740	143.829	138.501	138.197	2.800

LC = 0.5 ng/mL Atorvastatina

ng/mL	Atorvastatina	Atorvastatina	Atorvastatina	Atorvastatina	Atorvastatina	Promedio	%CV
0.25	68.744	64.4315	67.476	67.222	61.641	65.9029	4.333

Concentración	Señal/Ruido	Señal/Ruido	Señal/Ruido	Señal/Ruido	Señal/Ruido	Promedio
Blanco	No Señal	No Señal	No Señal	No Señal	No Señal	No Señal
0.25 ng/mL	11.000	12.000	12.000	11.000	12.000	11.600

Relación señal/ruido 11.600
LD = 0.25 ng/mL Atorvastatina

AAtorvastatina: Area de Atorvastatina

Criterios de Aceptación:

Para el LC se acepta un % CV < 20%

Para el LD se acepta la la concentración que produce una relación señal ruido de 2-3

4-Precisión:

Intra-Análisis

Repetibilidad: Condiciones experimentales

Análisis de cuatro concentraciones de Atorvastatina por quintuplicado sometidas a todo el proceso analítico.

Conc. 1.7 ng/mL							
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Promedio	%CV
8/10/09	1.682	1.686	1.627	1.622	1.622	1.648	2.007
9/10/09	1.640	1.528	1.673	1.537	1.618	1.599	3.983
10/10/09	1.512	1.861	1.912	1.669	1.732	1.737	9.168
12/10/09	1.829	1.796	1.640	1.690	1.639	1.719	5.183
						Promedio	5.085

Conc. 7.5 ng/mL							
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Promedio	%CV
8/10/09	7.525	7.478	7.424	7.323	7.387	7.427	1.057
9/10/09	6.645	6.959	7.028	6.326	7.374	6.866	5.795
10/10/09	7.494	7.557	7.880	6.907	7.428	7.453	4.713
12/10/09	7.246	7.332	7.164	7.048	7.310	7.220	1.610
						Promedio	3.293

Conc. 35 ng/mL							
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Promedio	%CV
8/10/09	34.131	34.222	34.708	34.097	34.187	34.269	0.730
9/10/09	31.745	32.167	33.739	34.081	35.517	33.450	4.560
10/10/09	34.919	38.173	34.170	34.447	32.064	34.755	6.334
12/10/09	33.442	32.709	32.934	33.006	32.558	32.930	1.024
						Promedio	3.162

Conc. 75 ng/mL							
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Promedio	%CV
10/8/09	71.336	72.924	72.948	73.300	70.800	72.262	1.544
9/10/09	71.789	70.353	66.638	69.822	69.519	69.624	2.705
10/10/09	69.721	71.131	68.949	70.111	71.595	70.301	1.519
12/10/09	70.786	72.839	70.834	71.108	71.870	71.487	1.219
						Promedio	1.747

Criterio de Aceptación: El %CV no debe ser mayor al 15%

Precisión

Inter-Análisis

Reproducibilidad intra-laboratorio.

Condiciones experimentales : Análisis de cuatro concentraciones distintas por quintuplicado, sometidos a todo el proceso analítico.

Conc. 1.7 ng/mL.							
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Promedio	%CV
8/10/09	1.682	1.686	1.627	1.622	1.622	1.648	
9/10/09	1.640	1.528	1.673	1.537	1.618	1.624	3.344
10/10/09	1.512	1.861	1.912	1.669	1.732	1.661	6.654
12/10/09	1.829	1.796	1.640	1.690	1.639	1.676	6.350
						Promedio	5.449

Conc. 7.5 ng/mL.							
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Promedio	%CV
8/10/09	7.525	7.478	7.424	7.323	7.387	7.427	
9/10/09	6.645	6.959	7.028	6.326	7.374	7.147	5.606
10/10/09	7.494	7.557	7.880	6.907	7.428	7.249	5.531
12/10/09	7.246	7.332	7.164	7.048	7.310	7.242	4.812
						Promedio	5.316

Conc. 33 ng/mL.							
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Promedio	%CV
8/10/09	34.131	34.222	34.708	34.097	34.187	34.269	
9/10/09	31.745	32.167	33.739	34.081	35.517	33.859	3.300
10/10/09	34.919	38.173	34.170	34.447	32.064	34.158	4.514
12/10/09	33.442	32.709	32.934	33.006	32.558	33.851	4.254
						Promedio	4.023

Conc. 75 ng/mL.							
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Promedio	%CV
8/10/09	71.336	72.924	72.948	73.300	70.800	72.262	
9/10/09	71.789	70.353	66.638	69.822	69.519	70.943	2.841
10/10/09	69.721	71.131	68.949	70.111	71.595	70.729	2.463
12/10/09	70.786	72.839	70.834	71.108	71.870	70.919	2.234
						Promedio	2.513

Criterio de Aceptación: El %CV no debe ser mayor al 15%

5.-Exactitud

La exactitud se obtiene con valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de reproducibilidad sometidos a la fórmula siguiente :

$$\%Error = \frac{(x-\mu)}{\mu} * 100$$

Donde: la x= Valor obtenido la μ = Valor esperado

Conc. 1.7 ng/mL						
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	
8/10/09	1.682	1.686	1.627	1.622	1.622	
9/10/09	1.640	1.528	1.673	1.537	1.618	
10/10/09	1.512	1.861	1.912	1.669	1.732	
12/10/09	1.829	1.796	1.640	1.690	1.639	
Promedio de todas las mediciones					1.676	
					%Error	-1.426

Conc. 7.5 ng/mL						
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	
8/10/09	7.525	7.478	7.424	7.323	7.387	
9/10/09	7.478	6.959	7.028	6.326	7.374	
10/10/09	7.424	7.557	7.880	6.907	7.428	
12/10/09	7.323	7.332	7.164	7.048	7.310	
Promedio de todas las mediciones					7.284	
					%Error	-2.885

Conc. 35 ng/mL						
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	
8/10/09	34.131	34.222	34.708	34.097	34.187	
9/10/09	31.745	32.167	33.739	34.081	35.517	
10/10/09	34.919	38.173	34.170	34.447	32.064	
12/10/09	33.442	32.709	32.934	33.006	32.558	
Promedio de todas las mediciones					33.851	
					%Error	-3.284

Conc. 75 ng/mL						
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	
8/10/09	71.336	72.924	72.948	73.300	70.800	
9/10/09	71.789	70.353	66.638	69.822	69.519	
10/10/09	69.721	71.131	68.949	70.111	71.595	
12/10/09	70.786	72.839	70.834	71.108	71.870	
Promedio de todas las mediciones					70.919	
Criterio de Aceptación: El %Error no debe ser mayor al $\pm 15\%$					%Error	-5.442

6. % Recuperación

A).- Condiciones experimentales: análisis de cuatro niveles de concentración de Atorvastatina en matriz biológica realizados por quintuplicado, y sometidos a todo proceso analítico

12/10/09		Atorvastatina en matriz biológica					Promedio	%CV	%Recuperación
Nivel	Conc. ag/ml.	Area1	Area2	Area3	Area4	Area5			
1	1.7	524.329	514.690	468.776	483.489	468.522	491.961	5.303	87.204
2	7.5	2111.234	2136.380	2087.271	2053.177	2130.038	2103.620	1.619	85.954
3	35.0	9785.864	9571.269	9637.215	9658.312	9526.883	9635.909	1.025	88.000
4	75.0	20726.604	21328.263	20740.851	20821.171	21044.376	20932.253	1.220	88.277
							Promedio		87.359

B).- Condiciones experimentales: análisis de cuatro niveles de concentración de Atorvastatina en solución realizados por triplicado y sometidos a todo proceso analítico

12/10/09		Atorvastatina en solución			Promedio	%CV
Nivel	Conc. ag/ml.	Area1	Area2	Area3		
1	1.7	578.580	552.993	560.857	564.147	2.324
2	7.5	2382.690	2473.998	2485.445	2447.378	2.301
3	35.0	10773.129	11232.000	10844.429	10949.853	2.255
4	75.0	23918.139	23803.047	23414.913	23712.033	1.112

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{Area Promedio de Atorvastatina en matriz}}{\text{Area Promedio de Atorvastatina en solución}} \times 100$$

Criterio de Aceptación: Idealmente entre 80 - 100%.

Excepcionalmente entre 50 - 80% (con precisión y exactitud aceptables)

7.-Estabilidad de Atorvastatina en función de Tiempo

Estabilidad de Atorvastatina en matriz biológica a -78°C±4°C en cuatro niveles de concentración por triplicado sometidas a todo el proceso analítico.

Conc. 1.7 ng/ml.						
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Promedio	%CV	% Error
8/10/09	1.620	1.614	1.553	1.596	2.320	-6.135
16/10/09	1.728	1.733	1.650	1.704	2.728	0.229
23/10/09	1.736	1.673	1.601	1.670	4.057	-1.776
29/10/09	1.767	1.609	1.563	1.646	6.516	-3.149
16/11/09	1.579	1.616	1.640	1.612	1.882	-5.204

Conc. 7.5 ng/ml.						
Fecha	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Promedio	%CV	% Error
8/10/09	6.964	7.065	6.926	6.985	1.030	-6.868
16/10/09	7.135	6.962	6.943	7.013	1.513	-6.490
23/10/09	7.371	7.463	7.438	7.424	0.640	-1.012
29/10/09	7.453	6.972	7.163	7.196	3.365	-4.050
16/11/09	8.124	7.769	7.811	7.901	2.453	5.350

Criterio de Aceptación: El %CV no debe ser mayor al 15%

Conclusión: La Atorvastatina es estable a -78°C±4°C en matriz biológica durante los 38 días monitoreados.

7.-Estabilidad de Atorvastatina en función de Tiempo.

Estabilidad de Atorvastatina en matriz biológica a -78°C±4°C en cuatro niveles de concentración por triplicado sometidos a todo el proceso analítico.

Fecha	Conc. 35 ng/mL			Promedio	%CV	% Error
	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3			
8/10/09	32.190	32.963	32.919	32.691	1.329	-6.598
16/10/09	32.204	32.445	31.556	32.068	1.434	-8.376
23/10/09	34.082	34.121	33.983	34.062	0.208	-2.681
29/10/09	33.496	32.445	33.141	33.027	1.619	-5.636
16/11/09	36.519	37.012	36.534	36.688	0.764	-4.824

Fecha	Conc. 75 ng/mL			Promedio	%CV	% Error
	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3			
8/10/09	71.016	73.201	71.432	71.883	1.615	-4.156
16/10/09	68.632	66.475	67.907	67.671	1.622	-9.772
23/10/09	74.974	75.754	73.994	74.907	1.177	-0.124
29/10/09	72.485	70.026	68.757	70.422	2.691	-6.104
16/11/09	76.148	74.064	73.190	74.467	2.041	-0.710

Criterio de Aceptación: El %CV no debe ser mayor al 15%

Conclusión: La Atorvastatina es estable a -78°C±4°C en matriz biológica durante los 38 días monitoreados.

8.- Estabilidad de los extractos de Atorvastatina en el Automaestreador del HPLC.

Condiciones experimentales: Extractos de cuatro concentraciones son analizados en el HPLC a diferentes tiempos.

Vial 1	
23/10/09	Conc. 1.7 ng/mL
Tiempo en Hrs	Area
3:36 p.m.	475.87870
6:29 p.m.	450.76570
7:27 p.m.	451.27300
8:25 p.m.	430.47230
9:23 p.m.	467.50770
10:26 p.m.	451.78030
11:19 p.m.	468.77600
12:17 a.m.	456.34630
1:15 a.m.	467.00030
2:13 a.m.	464.71730
3:11 a.m.	479.17610
Promedio	460.336
DE	13.919
%CV	3.024

Vial 2	
23/10/09	Conc. 1.7 ng/mL
Tiempo en Hrs	Area
3:41 p.m.	458.88290
6:34 p.m.	439.09700
7:32 p.m.	443.40930
8:30 p.m.	420.83300
9:28 p.m.	440.61900
10:21 p.m.	451.27300
11:24 p.m.	447.21430
12:22 a.m.	442.90200
1:20 a.m.	442.90200
2:18 a.m.	454.82430
3:16 a.m.	429.96490
Promedio	442.902
DE	10.773
%CV	2.432

8.- Estabilidad de los extractos de Atorvastatina en el Automuestreador del HPLC.

Condiciones experimentales: Extractos de cuatro concentraciones son analizados en el HPLC a diferentes tiempos

Vial 3	
23/10/09	Conc. 1.7 ng/mL
Tiempo en Hrs	Area
3:46 p.m.	439.60430
6:39 p.m.	427.17470
7:37 p.m.	418.04270
8:35 p.m.	433.77000
9:33 p.m.	434.78470
10:31 p.m.	427.93570
11:29 p.m.	435.03830
12:27 a.m.	432.50170
1:25 a.m.	429.20370
2:23 a.m.	453.04860
3:21 a.m.	452.54130
Promedio	434.877
DE	10.462
%CV	2.406

Vial 1	
23/10/09	Conc. 7.5 ng/mL
Tiempo en Hrs	Area
3:50 p.m.	1985.92820
6:44 p.m.	1942.32500
7:42 p.m.	1945.87610
8:40 p.m.	1862.41160
9:38 p.m.	1940.54960
10:36 p.m.	1935.50170
11:34 p.m.	1892.35260
12:32 a.m.	1924.06880
1:29 a.m.	1957.02950
2:27 a.m.	1935.98320
3:25 a.m.	1946.63650
Promedio	1935.333
DE	33.233
%CV	1.717

Criterio de Aceptación: %CV en la inyección 10%

8.- Estabilidad de los extractos de Atorvastatina en el Automuestreador del HPLC.

Condiciones experimentales: Extractos de cuatro concentraciones son analizados en el HPLC a diferentes tiempos

Vial 2	
23/10/09	Conc. 7.5 ng/mL.
Tiempo en Hrs	Area
3:55 p.m.	2010.57670
6:49 p.m.	1897.67990
7:47 p.m.	1932.12210
8:45 p.m.	1937.50540
9:43 p.m.	1884.74290
10:41 p.m.	1936.11300
11:38 p.m.	1859.37620
12:36 a.m.	1856.39940
1:34 a.m.	1966.14930
2:32 a.m.	1937.75910
3:30 a.m.	1950.18860
Promedio	1924.419
DE	46.390
%CV	2.411

Vial 3	
23/10/09	Conc. 7.5 ng/mL.
Tiempo en Hrs	Area
4:00 p.m.	2003.81010
6:53 p.m.	1967.68650
7:51 p.m.	1866.71910
8:49 p.m.	1879.16200
9:47 p.m.	1920.50980
10:45 p.m.	1902.69530
11:43 p.m.	1943.12310
12:41 a.m.	1922.95350
1:39 a.m.	1918.75470
2:37 a.m.	1890.29740
3:35 a.m.	1892.09890
Promedio	1918.892
DE	40.369
%CV	2.104

Criterio de Aceptación: %CV en la inyección 10%

8.- Estabilidad de los extractos de Atorvastatina en el Automuestreador del HPLC.

Condiciones experimentales: Extractos de cuatro concentraciones son analizados en el HPLC a diferentes tiempos.

Vial 1	
23/10/09	Conc. 35 ng/ml.
Tiempo en Hrs	Area
4:05 p.m.	9143.52860
6:58 p.m.	8977.45250
7:56 p.m.	9027.44330
8:54 p.m.	8946.64640
9:52 p.m.	8814.41950
10:51 p.m.	8936.75840
11:48 p.m.	8940.97510
12:46 a.m.	8894.26320
1:44 a.m.	9005.63070
2:42 a.m.	8820.36530
3:40 a.m.	8924.08150
Promedio	8948.324
DE	93.066
%CV	1.039

Vial 2	
23/10/09	Conc. 35 ng/ml.
Tiempo en Hrs	Area
4:10 p.m.	9154.05890
7:03 p.m.	9134.91520
8:01 p.m.	8984.36140
8:59 p.m.	9116.05770
9:57 p.m.	8833.49840
10:55 p.m.	8859.23070
11:53 p.m.	9003.41010
12:51 a.m.	8944.88870
1:49 a.m.	9103.81240
2:47 a.m.	9035.99770
3:45 a.m.	8977.47070
Promedio	9011.609
DE	105.990
%CV	1.176

Criterio de Aceptación: %CV en la inyección 10%.

8.- Estabilidad de los extractos de Atorvastatina en el Autoanalisador del HPLC.

Condiciones experimentales: Extractos de cuatro concentraciones son analizados en el HPLC a diferentes tiempos

Vial 3	
23/10/09	Conc. 35 ng/mL
Tiempo en Hrs	Area
4:14 p.m.	9117.15970
7:08 p.m.	8830.94380
8:06 p.m.	8915.32950
9:04 p.m.	8950.43310
10:02 p.m.	9046.17240
11:00 p.m.	8936.22070
11:58 p.m.	8992.07950
12:56 a.m.	8917.13880
1:53 a.m.	8863.84590
2:51 a.m.	8941.51320
3:49 a.m.	8947.80220
Promedio	8950.785
DE	79.436
%CV	0.887

Criterio de Aceptación: %CV en la inyección 10%

8.- Estabilidad de los extractos de Atorvastatina en el Automuestreador del HPLC.

Condiciones experimentales: Extractos de cuatro concentraciones son analizados en el HPLC a diferentes tiempos.

Vial 1	
23/10/09	Conc. 75 µg/mL
Tiempo en Hrs	Area
4:19 p.m.	20101.56400
7:13 p.m.	19699.44400
8:11 p.m.	19937.13500
9:09 p.m.	19490.83300
10:07 p.m.	19317.93800
11:05 p.m.	19496.59200
12:02 a.m.	19378.65800
1:00 a.m.	19298.65700
1:58 a.m.	19591.89000
2:56 a.m.	19779.05100
3:54 a.m.	19578.05100
Promedio	19606.347
DE	254.804
%CV	1.300

Vial 2	
23/10/09	Conc. 75 µg/mL
Tiempo en Hrs	Area
4:24 p.m.	20310.45200
7:18 p.m.	20137.72000
8:16 p.m.	20180.86500
9:13 p.m.	20053.24000
10:11 p.m.	20219.80600
11:09 p.m.	20237.74400
12:07 a.m.	19980.82200
1:05 a.m.	20185.30400
2:03 a.m.	20681.44800
3:01 a.m.	20719.00400
3:59 a.m.	20824.13600
Promedio	20320.958
DE	285.975
%CV	1.407

Criterio de Aceptación: %CV en la inyección 10%

8.- Estabilidad de los extractos de Atorvastatina en el Automuestreador del HPLC.

Condiciones experimentales: Extractos de cuatro concentraciones son analizados en el HPLC a diferentes tiempos

Vial 3	
23/10/09	Conc: 75 ng/ml.
Tiempo en Hrs	Area
4:29 p.m.	19838.89000
7:22 p.m.	19837.03800
8:20 p.m.	19197.78300
9:18 p.m.	19611.40700
10:16 p.m.	19620.23300
11:14 p.m.	19625.86900
12:12 a.m.	19408.52600
1:10 a.m.	19587.80500
2:08 a.m.	19566.46800
3:06 a.m.	19852.84500
4:04 a.m.	19883.72500
Promedio	19639.144
DE	210.179
%CV	1.070

Criterio de Aceptación: %CV en la inyección 10%

9.- Estabilidad (Ciclos de congelación y descongelación).

Condiciones experimentales: Muestras de Atorvastatina en matriz biológica de cuatro concentraciones son sometidas a 1 y 2 ciclos de congelación-descongelación (Congelación a $-78^{\circ}\pm 4^{\circ}\text{C}$. Descongelación a temperatura del laboratorio).

Muestras con 2 ciclos de congelación y descongelación.

Conc. 1.7 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
16/10/09	1.815	1.758	1.628	1.733	5.533	1.967

Conc. 7.5 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
16/10/09	7.803	7.956	7.690	7.816	1.704	-4.216

Conc. 35 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
16/10/09	34.785	34.196	35.427	34.803	1.770	-0.564

Conc. 75 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
16/10/09	64.449	74.451	74.134	71.011	8.006	-5.318

Criterio de Aceptación: El %CV no debe ser mayor al 15% y el % de Error entre $\pm 15\%$

Conclusión: El % de error de las muestras sometidas a dos ciclos de congelación y descongelación está entre $\pm 15\%$ del valor esperado y el %CV es menor al 15%

Por lo tanto las muestras de plasma con Atorvastatina soportan dos ciclos de congelación y

9.- Estabilidad (Ciclos de congelación y descongelación).

Condiciones experimentales: Muestras de Acetaminofén en matriz biológica de cuatro concentraciones son sometidas a 1 y 2 ciclos de congelación-descongelación (Congelación a $-78^{\circ} \pm 4^{\circ}\text{C}$, Descongelación a temperatura del laboratorio).

Muestras con 1 ciclo de congelación y descongelación.

Conc. 1.7 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
16/10/09	1.728	1.733	1.650	1.704	2.728	0.229

Conc. 7.5 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
16/10/09	7.135	6.962	6.943	7.013	1.513	-6.490

Conc. 35 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
16/10/09	32.204	32.445	31.556	32.068	1.434	-8.376

Conc. 75 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
16/10/09	68.632	66.475	67.907	67.671	1.622	-9.772

Criterio de Aceptación: El %CV no debe ser mayor al 15% y el % de Error entre $\pm 15\%$

Conclusión: El % de error de las muestras sometidas a dos ciclos de congelación y descongelación está entre $\pm 15\%$ del valor esperado y el %CV es menor al 15%

Por lo tanto las muestras de plasma con Acetaminofén soportan dos ciclos de congelación y

10.-Muestras en plasma A) hemolizado y B) quiloso.

Condiciones experimentales: Muestras de Atorvastatina en matriz biológica con hemólisis o quilosa de cuatro concentraciones por triplicado.

A) Muestras en plasma hemolizado

Conc. 1.7 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
23/10/09	1.654	1.620	1.670	1.648	1.556	-3.076

Conc. 7.5 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
23/10/09	7.363	7.244	7.385	7.331	1.036	-2.258

Conc. 35 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
23/10/09	34.159	33.988	33.790	33.979	0.544	-2.918

Conc. 75 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
23/10/09	72.623	72.641	72.840	72.702	0.166	-3.065

B) Muestras en plasma quiloso.

Conc. 1.7 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
23/10/09	1.528	1.650	1.395	1.591	3.844	-6.418

Conc. 7.5 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
23/10/09	7.047	7.236	7.205	7.163	1.416	-4.500

Conc. 35 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
23/10/09	33.234	33.582	33.248	33.355	0.590	-4.701

Conc. 75 ng/mL						
Fecha	Conc.	Conc.	Conc.	Promedio	%CV	%Error
23/10/09	72.371	74.623	72.807	73.267	1.630	-2.310

Criterio de Aceptación: El %CV no debe ser mayor al 15% y el % de Error entre $\pm 15\%$

Conclusión: El % de error de las muestras de Atorvastatina en plasma hemolizado y quiloso está entre $\pm 15\%$ del valor esperado y el %CV menor al 15%

11.- Tolerancia

Condiciones experimentales: Muestras de Atorvastatina en cuatro concentraciones (por triplicado) son sometidas al proceso de extracción y analizadas con fase móvil:

A) Agua con Ácido Fórmico 0.1%, 500 mL de agua + 500 μ L de Ácido Fórmico (sin modificación).

B) Agua con Ácido Fórmico, 500 mL de Agua + 450 μ L de Ácido Fórmico (con modificación).

Archivo ATO161109 fase sin modificación.

Conc. 1.7 ng/mL					
Fecha	Área	Área	Área	Promedio	%CV
16/11/09	1.579	1.616	1.640	1.612	1.882

Conc. 7.5 ng/mL					
Fecha	Área	Área	Área	Promedio	%CV
16/11/09	8.124	7.769	7.811	7.901	2.433

Conc. 35 ng/mL					
Fecha	Área	Área	Área	Promedio	%CV
16/11/09	36.519	37.012	36.534	36.688	0.764

Conc. 75 ng/mL					
Fecha	Área	Área	Área	Promedio	%CV
16/11/09	76.148	74.064	73.190	74.467	2.041

Archivo ATO161109% fase sin modificación

Conc. 1.7 ng/mL					
Fecha	Área	Área	Área	Promedio	%CV
16/11/09	1.710	1.515	1.605	1.610	6.083

Conc. 7.5 ng/mL					
Fecha	Área	Área	Área	Promedio	%CV
16/11/09	7.377	7.599	7.395	7.457	1.650

Conc. 35 ng/mL					
Fecha	Área	Área	Área	Promedio	%CV
16/11/09	35.462	35.115	36.028	35.535	1.297

Conc. 75 ng/mL					
Fecha	Área	Área	Área	Promedio	%CV
16/11/09	72.587	74.578	70.432	72.532	2.859

Diferencia $\frac{\text{Área con modificación} - \text{Área sin modificación}}{\text{Área sin modificación}} \times 100$

Área sin modificación

Atorvastatina

1.7 ng/mL -0.095

7.5 ng/mL -5.619

35 ng/mL -3.144

75 ng/mL -2.599

Criterios de aceptación: %CV menor o igual al $\pm 15\%$ y diferencia menor al $\pm 15\%$ del valor esperado

Conclusión: La diferencia entre las áreas de Atorvastatina con modificación y sin modificación en la fase son menores al $\pm 15\%$ del valor esperado.

Por lo tanto el método tolera este pequeño cambio en la fase.

ANEXO 2

EJEMPLO DEL REPORTE DE UN DÍA DE CORRIDA

REPORTE DE LA CONCENTRACIÓN DE: ATORVASTATINA EN PLASMA							
Protocolo:				Fecha de reporte:			
Fecha de recepción:				Muestreo realizado en:			I
Resultados: ATORVASTATINA		Método: HPLC-MS		Analista:		Fecha de Corrida analítica:	
Clave de Muestra	Atorvastatina Conc ng/mL	Clave de Muestra	Atorvastatina Conc ng/mL	Clave de Muestra	Atorvastatina Conc ng/mL	Clave de Muestra	Atorvastatina Conc ng/mL
D21P1-01	-	D22P1-01	-	D23P1-01	-		
D21P1-02	-	D22P1-02	-	D23P1-02	3.684		
D21P1-03	1.094	D22P1-03	0.678	D23P1-03	10.611		
D21P1-04	2.382	D22P1-04	1.968	D23P1-04	12.949		
D21P1-05	2.140	D22P1-05	12.890	D23P1-05	7.499		
D21P1-06	7.270	D22P1-06	6.058	D23P1-06	5.366		
D21P1-07	3.545	D22P1-07	4.311	D23P1-07	4.299		
D21P1-08	2.335	D22P1-08	3.281	D23P1-08	3.724		
D21P1-09	1.545	D22P1-09	2.742	D23P1-09	3.409		
D21P1-10	1.387	D22P1-10	2.698	D23P1-10	3.056		
D21P1-11	1.040	D22P1-11	2.718	D23P1-11	2.704		
D21P1-12	1.319	D22P1-12	4.169	D23P1-12	4.260		
D21P1-13	0.946	D22P1-13	2.776	D23P1-13	2.447		
D21P1-14	0.938	D22P1-14	2.788	D23P1-14	1.940		
D21P1-15	0.691	D22P1-15	2.248	D23P1-15	1.842		
D21P1-16	0.622	D22P1-16	1.799	D23P1-16	1.859		
D21P1-17	-	D22P1-17	1.683	D23P1-17	1.157		
D21P1-18	-	D22P1-18	-	D23P1-18	0.610		
D21P1-19	-	D22P1-19	-	D23P1-19	-		
D21P1-20	-	D22P1-20	-	D23P1-20	-		
D21P2-01	-	D22P2-01	-	D23P2-01	-		
D21P2-02	-	D22P2-02	15.470	D23P2-02	-		
D21P2-03	0.802	D22P2-03	10.304	D23P2-03	-		
D21P2-04	1.090	D22P2-04	6.493	D23P2-04	-		
D21P2-05	1.012	D22P2-05	3.356	D23P2-05	0.538		
D21P2-06	0.807	D22P2-06	2.455	D23P2-06	1.350		
D21P2-07	1.411	D22P2-07	2.175	D23P2-07	7.396		
D21P2-08	0.855	D22P2-08	2.127	D23P2-08	4.334		
D21P2-09	1.080	D22P2-09	1.859	D23P2-09	4.677		
D21P2-10	1.031	D22P2-10	1.532	D23P2-10	5.305		
D21P2-11	1.505	D22P2-11	2.031	D23P2-11	4.300		
D21P2-12	2.551	D22P2-12	1.442	D23P2-12	7.318		
D21P2-13	1.492	D22P2-13	1.072	D23P2-13	4.047		
D21P2-14	1.425	D22P2-14	0.839	D23P2-14	3.451		
D21P2-15	1.034	D22P2-15	0.899	D23P2-15	2.152		
D21P2-16	1.237	D22P2-16	-	D23P2-16	2.008		
D21P2-17	-	D22P2-17	-	D23P2-17	1.450		
D21P2-18	-	D22P2-18	-	D23P2-18	-		
D21P2-19	-	D22P2-19	-	D23P2-19	-		
D21P2-20	-	D22P2-20	-	D23P2-20	-		

ANEXO 3

CROMATOGRAMAS

Quantitative Analysis Sample Report

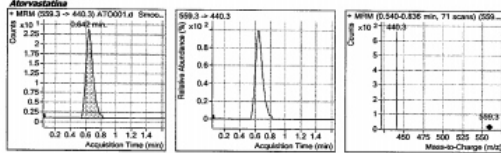
Batch Info
Batch Data Path D:\MassHunter\QuantResults\ATO095-01\batch_1m
Analysis Time 2/25/2011 9:52 AM **Analyst Name** Administrator
Report Time 2/25/2011 9:57 AM **Reporter Name** Administrator
Last Calib Update 2/25/2011 9:52 AM **Batch State** Processed

Analysis Info
Data File AT0001.d **Sample Name** 0.5 ng/ml
Sample Type Calibration **Dilution** 1
Acq Method File AT000A-esi-MRM.m **Acq Time** 2/24/2011 12:36
Position 1 **Inj Vol** -1.00
Comment **Sample Info**
SamplePosition 1 **TripName**
Vial **AcqDateTime** 2011-02-24T12:36:10-06:00

Quantitation Results

Compound	RT	Response	Final Conc
Atrazotrina	0.642	149	0.4949 ng/ml

Compound Graphics



Quantitative Analysis Sample Report

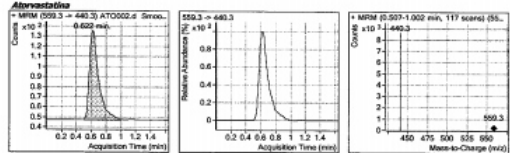
Batch Info
Batch Data Path D:\MassHunter\QuantResults\ATO095-01\batch_1m
Analysis Time 2/25/2011 9:52 AM **Analyst Name** Administrator
Report Time 2/25/2011 9:57 AM **Reporter Name** Administrator
Last Calib Update 2/25/2011 9:52 AM **Batch State** Processed

Analysis Info
Data File AT0002.d **Sample Name** 2.5 ng/ml
Sample Type Calibration **Dilution** 1
Acq Method File AT000A-esi-MRM.m **Acq Time** 2/24/2011 12:41
Position 2 **Inj Vol** -1.00
Comment **Sample Info**
SamplePosition 2 **TripName**
Vial **AcqDateTime** 2011-02-24T12:41:51-06:00

Quantitation Results

Compound	RT	Response	Final Conc
Atrazotrina	0.622	768	2.6364 ng/ml

Compound Graphics



REFERENCIAS

1. Gómez-Viquez H, Rico-Flores G. El paradigma de biotecnología y la medicina genómica: ¿Un obstáculo o una oportunidad de integración para la industria farmacéutica mexicana? *Sinnco*. 2008.
2. Gómez-Lechón MJ, Cascales M. Las ómicas en el desarrollo de nuevos fármacos. *Las ómicas: genómica, proteómica, citómica y metabolómica: modernas tecnologías para el desarrollo de fármacos*. Madrid: Instituto de España; Real Academia de Farmacia; 2005:301.
3. Carvajal Villanueva OR. Futuro de las Fusiones en la Industria Farmacéutica Mundial. *Revista Negotium*. 2005;1(1):12-34.
4. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. Drug Discovery and Development UNDERSTANDING THE R&D PROCESS. 2007.
5. Verjan-García N. Biotechnology, beginning with recombinant DNA toward a personalized medicine. 2009;13(1):71-76.
6. Baye T M, Wilke RA. Mapping genes that predict treatment outcome in admixed populations. *Pharmacogenomics*. 2010;10(6):465-477.
7. McGuire AL. 1000 Genomes on the Road to Personalized Medicine. *Per Med*. 2008;5(3):195-197.

8. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research, Center for Devices and Radiological Health. Clinical Pharmacogenomics: Premarket Evaluation in Early-Phase Clinical Studies and Recommendations for Labeling. In: DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, ed2013.
9. Syahmi AR, Vijayarathna S, Sasidharan S, et al. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Elaeis guineensis* Jacq., (oil palm leaf) methanol extract. *Molecules*. Nov 2010;15(11):8111-8121.
10. Miret S, De Groene EM, Klaffke W. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. *J Biomol Screen*. Mar 2006;11(2):184-193.
11. Puccinelli E, Gervasi PG, Longo V. Xenobiotic metabolizing cytochrome P450 in pig, a promising animal model. *Curr Drug Metab*. Jul 2011;12(6):507-525.
12. European Medicine Agency. GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: QUALITY ISSUES. In: USE CFMPFH, ed. London: EMEA; 2006.
13. Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. Pharmacogenetics. In: M PL, ed. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. Seven ed: The McGraw-Hill; 2008:2559.
14. Secretaria de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. *NOM-177-SSA1-1998*: DOF; 1998.

15. Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS, Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med.* Dec 15 2002;113(9):746-750.
16. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos.* May 2006;34(5):880-886.
17. Ingelman-Sundberg M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol.* Sep 1 2005;207(2 Suppl):52-56.
18. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* Dec 2007;116(3):496-526.
19. Ingelman-Sundberg M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res.* Oct 1 2001;482(1-2):11-19.
20. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med.* 2006;57:119-137.
21. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA.* Apr 15 1998;279(15):1200-1205.
22. Pirmohamed M, James S, Meakin S, et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ.* Jul 3 2004;329(7456):15-19.
23. Nelson MR, Bacanu SA, Mosteller M, et al. Genome-wide approaches to identify pharmacogenetic contributions to adverse drug reactions. *Pharmacogenomics J.* Feb 2009;9(1):23-33.

24. Andersson TB, Sjoberg H, Hoffmann KJ, et al. An assessment of human liver-derived in vitro systems to predict the in vivo metabolism and clearance of almokalant. *Drug Metab Dispos.* May 2001;29(5):712-720.
25. Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc.* Oct 19 1957;165(7):835-837.
26. Motulsky AG, Qi M. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. *J Zhejiang Univ Sci B.* Feb 2006;7(2):169-170.
27. Marshall A. Genset-Abbott deal heralds pharmacogenomics era. *Nat Biotechnol.* Sep 1997;15(9):829-830.
28. O'Shaughnessy KM. HapMap, pharmacogenomics, and the goal of personalized prescribing. *Br J Clin Pharmacol.* Jun 2006;61(6):783-786.
29. Genomes Project C, Abecasis GR, Altshuler D, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* Oct 28 2010;467(7319):1061-1073.
30. Lewin B. *Genes IX.* Massachusetts: Jones And Bartlett Publishers; 2008.
31. Madsen BE, Villesen P, Wiuf C. Short tandem repeats and genetic variation. *Methods Mol Biol.* 2010;628:297-306.
32. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* Aug 30 1990;323(9):561-565.
33. Kitzmiller JP, Groen DK, Phelps MA, Sadee W. Pharmacogenomic testing: relevance in medical practice: why drugs work in some patients but not in others. *Cleve Clin J Med.* Apr 2011;78(4):243-257.
34. Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin.* Jan-Feb 2009;59(1):42-55.

35. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*. Jan 22 2009;360(4):354-362.
36. Mallal S, Phillips E, Carosi G, et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med*. Feb 7 2008;358(6):568-579.
37. Kudzma EC, Carey ET. Pharmacogenomics: personalizing drug therapy. *Am J Nurs*. Oct 2009;109(10):50-57; quiz 58.
38. Dumond JB, Vourvahis M, Rezk NL, et al. A phenotype-genotype approach to predicting CYP450 and P-glycoprotein drug interactions with the mixed inhibitor/inducer tipranavir/ritonavir. *Clin Pharmacol Ther*. Jun 2010;87(6):735-742.
39. Dumauval C, Miao X, Daly TM, et al. Comprehensive assessment of metabolic enzyme and transporter genes using the Affymetrix Targeted Genotyping System. *Pharmacogenomics*. Mar 2007;8(3):293-305.
40. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, et al. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem*. Jul 2005;51(7):1137-1144.
41. Lennernas H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(13):1141-1160.
42. Ahmet T KS, Gautam A, Gigras R, Kothari M, Saha N, Batra V, Paliwal J. Bioavailability and Interaction Potential of Atorvastatin and Losartan on Coadministration in Healthy Human Subjects. *J Bioequiv Availab*. 2009;1(1):018-027.
43. Jacobsen W, Kuhn B, Soldner A, et al. Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. *Drug Metab Dispos*. Nov 2000;28(11):1369-1378.

44. Riedmaier S, Klein K, Hofmann U, et al. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) polymorphisms affect atorvastatin lactonization in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther.* Jan 2010;87(1):65-73.
45. Chen C, Mireles RJ, Campbell SD, et al. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. *Drug Metab Dispos.* Apr 2005;33(4):537-546.
46. Romaine SP, Bailey KM, Hall AS, Balmforth AJ. The influence of SLCO1B1 (OATP1B1) gene polymorphisms on response to statin therapy. *Pharmacogenomics J.* Feb 2010;10(1):1-11.
47. Schwarz UI, Meyer zu Schwabedissen HE, Tirona RG, et al. Identification of novel functional organic anion-transporting polypeptide 1B3 polymorphisms and assessment of substrate specificity. *Pharmacogenet Genomics.* Mar 2011;21(3):103-114.
48. Keskitalo JE, Zolk O, Fromm MF, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ, Niemi M. ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther.* Aug 2009;86(2):197-203.
49. Mangravite LM, Thorn CF, Krauss RM. Clinical implications of pharmacogenomics of statin treatment. *Pharmacogenomics J.* Nov-Dec 2006;6(6):360-374.
50. Lins RL, Matthys KE, Verpooten GA, et al. Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* May 2003;18(5):967-976.
51. Leon-Cachon RB, Ascacio-Martinez JA, Barrera-Saldana HA. Individual response to drug therapy: bases and study approaches. *Rev Invest Clin.* Jul-Aug 2012;64(4):364-376.

52. Rosales A, Alvear M, Cuevas A, Saavedra N, Zambrano T, Salazar LA. Identification of pharmacogenetic predictors of lipid-lowering response to atorvastatin in Chilean subjects with hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta*. Feb 18 2012;413(3-4):495-501.
53. Ma L, Dong J, Chen X J, Wang G J. Development and Validation of Atorvastatin by LC–ESI–MS and Application in Bioequivalence Research in Healthy Chinese Volunteers. *Chromatographia*. 2007;65(11-12):737-741.
54. Stanis B, Kania L. Validation of HPLC method for determination of atorvastatin in tablets and for monitoring stability in solid phase. *Acta Pol Pharm*. Nov-Dec 2006;63(6):471-476.
55. Sambrook J, Russell D W. Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol 1. Third ed. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
56. Miyaji K, Nagao K, Bannai M, et al. Characteristic metabolism of free amino acids in cetacean plasma: cluster analysis and comparison with mice. *PLoS One*. 2010;5(11):e13808.
57. Gonzalez HM, Romero EM, Peregrina AA, et al. CYP2C19- and CYP3A4-dependent omeprazole metabolism in West Mexicans. *J Clin Pharmacol*. Nov 2003;43(11):1211-1215.
58. Goosen TC, Bauman JN, Davis JA, et al. Atorvastatin glucuronidation is minimally and nonselectively inhibited by the fibrates gemfibrozil, fenofibrate, and fenofibric acid. *Drug Metab Dispos*. Aug 2007;35(8):1315-1324.
59. Park JE, Kim KB, Bae SK, Moon BS, Liu KH, Shin JG. Contribution of cytochrome P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin. *Xenobiotica*. Sep 2008;38(9):1240-1251.

60. Reyes-Hernandez OD, Lares-Asseff I, Sosa-Macias M, Vega L, Albores A, Elizondo G. A comparative study of CYP3A4 polymorphisms in Mexican Amerindian and Mestizo populations. *Pharmacology*. 2008;81(2):97-103.
61. Cavalli SA, Hirata MH, Hirata RD. Detection of MboII polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Chem*. Feb 2001;47(2):348-351.
62. Garsa AA, McLeod HL, Marsh S. CYP3A4 and CYP3A5 genotyping by Pyrosequencing. *BMC Med Genet*. May 9 2005;6:19.
63. Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, et al. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. Aug 2004;14(8):523-525.
64. Henningsson A, Marsh S, Loos WJ, et al. Association of CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 polymorphisms with the pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin Cancer Res*. Nov 15 2005;11(22):8097-8104.
65. Dong Q, Xu B, Tan Y, et al. The genetic variability of MDR1 C3435T polymorphisms in four Southern Chinese populations. *Biomed Pharmacother*. Nov 2009;63(9):658-662.
66. Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH. Influence of genetic variation in CYP3A4 and ABCB1 on dose decrease or switching during simvastatin and atorvastatin therapy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. Jan 2010;19(1):75-81.
67. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, et al. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet*. Aug 4 2001;358(9279):383-384.